ANREICHERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER NEUEN MUREINHYDROLASE, N-ACETYL-MURAMYL-L-ALANIN AMIDASE, AUS DEM HUMANSERUM

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karl-Universität Tübingen

vorgelegt
von
STEFAN MOLLNER
aus Altdorf

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0021

ANREICHERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER NEUEN MUREIN-HYDROLASE, N-ACETYL-MURAMYL-L-ALANIN AMIDASE, AUS DEM HUMANSERUM

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt
von
Stefan Mollner
aus Altdorf

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	21. März 1984
Dekan:	Professor Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Braun
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. K. Hantke

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun angefertigt.

Herrn Professor Braun danke ich für die Überlassung der Themas, die in jeder Hinsicht großzügige Unterstützung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Weiter bedanke ich mich bei

Herrn Privatdozenten Dr. K. Hantke für die vielen, wertvollen Anregungen und praktischen Hilfen,

Herrn Privatdozenten Dr. J.-V. Höltje für die Beratung bei papierchromatographischen Trennungen und für die Bereitstellung von Substanzen,

Herrn Dr. P. Fiedler für die brauchbaren Tips und Hilfen beim Umgang mit HPLC,

Herrn Privatdozenten Dr. D. Baron für seine tatkräftige Unterstützung bei der Immunisierung der Kaninchen und für die schmerzlose Blutentnahme,

Herrn Dr. H. Rotering für wichtige Anregungen zu Beginn dieser Arbeit,

Herrn Dr. K. Komischke für die Hinweise bei der Durchführung von Proteinblotting,

Frau R. Burkhardt für die Durchsicht dieser Arbeit nach Tippfehlern

und Frau M. Schneider die prompte Erledigung anfallender Sekretariatsarbeiten.

Meinen Laborkollegen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, besonders Herrn Dr. R. Dreher für die vielen, anregenden Gespräche.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II für die gute Zusammenarbeit und das insgesamt angenehme Arbeitsklima.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1.	Materialien	6
2.1.1.	Chemikalien, Proteine	6
2.1.2.	Nährmedien	8
2.1.3.	Bakterienstämme	8
2.2.	Methoden	9
2.2.1.	Gewinnung von Substrat für die Mureinhydrolasen	9
2.2.1.1.	Isolierung von ^{3}H-Dap-markiertem Murein	9
2.2.1.2.	Isolierung von Murein-Lipoprotein-Komplex	9
2.2.1.3.	Präparation von lipoproteinfreiem Murein	10
2.2.1.4.	Isolierung von Murein aus M. lysodeikticus	10
2.2.2.	Messung von Mureinhydrolaseaktivität mit ^{3}H-Dap-markierten Murein-Sacculi als Substrat	11
2.2.3.	Inaktivierung von Humanlysozym durch Antikörper aus Ziegen	11
2.2.4.	Inaktivierung von Humanlysozym durch zweite Antikörper	11
2.2.5.	Proteinbestimmung mit Fluram	12
2.2.6.	Proteinbestimmung mit Coomassie-Blue	12
2.2.7.	Aminosäureanalysen	13
2.2.8.	NaDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	13
2.2.9.	Anfärben von Polyacrylamidgelen	15
2.2.9.1.	Nachweis durch Coomassie-Blue	15
2.2.9.2.	Nachweis durch Silbernitrat	15
2.2.9.3.	Nachweis von Glykoproteinen	16
2.2.10.	Behandlung von osmotisch geschockten Zellen mit Amidase	17
2.2.11.	Test der Amidasewirkung auf gram-positive Bakterien	18
2.2.11.1.	Lebendzellzahlbestimmung	18
2.2.11.2.	Spottest	18
2.2.12.	Papierchromatographie	19
2.2.13.	Reinigung der Amidase	20
2.2.13.1.	Gewinnung von Serum	20

		Seite
2.2.13.2.	Serumvorbereitung für Ionenaustausch-chromatographie	20
2.2.13.3.	Säulenchromatographische Methoden	20
2.2.13.3.1.	Reinigung mittels DEAE-Sephadex A 50	20
2.2.13.3.2.	Reinigung mittels QAE-Sephadex A 50	21
2.2.13.3.3.	Reinigung durch Gelfiltration	21
2.2.13.3.4.	Reinigung mittels einer Phenylsepharose-säule	22
2.2.13.4.	Enzymreinigung mittels FPLC-System	23
2.2.14.	Substratreinigung über HPLC	24
2.2.15.	Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität	25
2.2.16.	pH-Optimum der Amidase	25
2.2.16.1.	^{3}H-Dap-N-Acetyl-glucosaminyl(ß1-4)-1,6-Anhydro-N-acetyl-muraminyl-Tri-(Tetra-)peptid als Substrat	25
2.2.16.2.	^{3}H-Dap-Murein-Sacculi als Substrat	26
2.2.17.	Molekulargewichtsbestimmung	26
2.2.18.	Immunchemische Methoden	27
2.2.18.1.	Gewinnung von Antigen	27
2.2.18.2.	Gewinnung des Antiserums	27
2.2.18.3.	Antikörperreinigung	27
2.2.18.4.	Untersuchung der Spezifität des Antiserums-"Gelblotting"	28
3.	Ergebnisse	30
3.1.	Methode zum Nachweis von Mureinhydrolasen im Serum	30
3.2.	Inaktivierung von Lysozym im Humanserum	32
3.2.1.	Inaktivierung von Lysozym durch die Anti-Humanlysozym IgG-Fraktion aus Ziege	32
3.2.2.	Inaktivierung von Lysozym durch zweite Antikörper	33
3.3.	Auftrennung von Humanserum über eine Gelfiltration mit Sephadex G 50	34
3.4.	Spaltungs- und Substratspezifität der neuen Serumhydrolase	35
3.4.1.	Papierchromatographische Auftrennung der Mureinspaltstücke mit dem Laufmittelsystem Isobuttersäure-Ammoniumhydroxid	35

		Seite
3.4.2.	Spaltung von Muropeptiden	37
3.4.3.	Präparative Auftrennung der Enzymspaltprodukte von Mureinsacculi	39
3.4.4.	Nachweis der Abspaltung des Lipoproteins von den Zuckerketten	43
3.4.4.1.	HPLC-Gelfiltration nach Fällung mit N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid	44
3.4.4.2.	HPLC-Gelfiltration nach Spaltung mit Lysozym	44
3.4.4.3.	HPLC-Gelfiltration nach Spaltung mit Proteinase K	45
3.4.5.	Murein von Micrococcus lysodeikticus als Substrat	45
3.5.	Charakterisierung der Amidase	49
3.5.1.	Das pH-Optimum	49
3.5.1.1.	Muropeptid als Substrat	49
3.5.1.2.	Mureinsacculi als Substrat	49
3.5.2.	Proteaseinhibitoren	51
3.5.3.	Reduktionsmittel, Detergenzien	52
3.5.4.	Bestimmung des Molekulargewichts	53
3.6.	Reinigung des Enzyms	54
3.6.1.	Fällung mit Ammoniumsulfat	54
3.6.2.	Ionenaustauschchromatographie	54
3.6.2.1.	Serumvorbereitung für den Ionenaustauscher	54
3.6.2.2.	Ionenaustauscher QAE-Sephadex A 50	54
3.6.2.3.	Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sephadex A 50	55
3.6.3.	Gelfiltration	58
3.6.4.	Chromatographie durch hydrophobe Wechselwirkungen	59
3.6.5.	FPLC-System	60
3.6.5.1.	Chromatographie an Mono Q	60
3.6.5.2.	Abspaltung von Sialinsäure	62
3.6.6.	Reinigungsgang	65
3.6.7.	Weitere Versuche die Amidase zu reinigen	68
3.6.7.1.	Bindung an das Substrat	68
3.6.7.1.2.	Chitin	68
3.6.7.1.2.	Mureinsäule	68
3.6.7.2.	Antikörper gegen die Amidase	68

		Seite
3.6.7.2.1.	Reinigung des Antiserums	69
3.6.7.2.2.	Test der Antikörper auf Enzyminhibierung	
3.6.7.2.3.	ELISA am geblotteten Gel	70
3.6.6.3.	Untersuchung der Humanmilch auf Amidase	70
3.7.	Wirkung der Amidase auf Bakterien	71
3.7.1.	Gram-positive Bakterien	71
3.7.2.	Gram-negative Bakterien - E. coli	71
3.7.2.1.	Wirkung der Amidase auf osmotisch geschockte Zellen	71
3.7.2.2.	Wirkung der Amidase nach EDTA-Behandlung und osmotischem Schock der Zellen	72
4.	Diskussion	74
4.1.	Spaltungsspezifität	74
4.2.	Substratspezifität	75
4.3.	Charakterisierung	76
4.4.	Reinigung	77
4.5.	Biologische Bedeutung	78
5.	Zusammenfassung	81
6.	Literaturverzeichnis	82

Abkürzungen

A	Ampère
Å	Ångström
Abb.	Abbildung(en)
cpm	counts per minunte
Dap	Diaminopimelinsäure
DEAE	Diäthylaminoäthyl
deion.	deionisiert
dest.	destilliert
EDTA	Äthylendiaminotetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
l	Liter
M	molar
MAC	Membrane Attack Complex
Min.	Minute(n)
NaDS	Natriumdodecylsulfat
OD_n	optische Dichte bei n nm
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
QAE	Diäthyl-(2-hydroxypropyl)-aminoäthyl
RT	Raumtemperatur
Std.	Stunde(n)
Tab.	Tabelle(n)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume

1. Einleitung

Vor fast einhundert Jahren wurde zum ersten Male über die Fähigkeit des Blutes berichtet, Bakterien zu töten (1,2,). Seither wurden viele Versuche unternommen diese bakteriziden Faktoren zu isolieren und zu charakterisieren. BUCHNER (3) konnte 1889 zeigen, daß Serum durch Erhitzen auf 56°C bakterientötende Wirkung gegenüber gram-negativen Bakterien einbüßt. In den zwanziger Jahren fand PETTERSSON bei der Untersuchung verschiedener Seren eine Klasse von thermostabilen Substanzen, welche gegen gram-positive Bakterien wirkten. Er prägte für diese hitzestabilen Faktoren den Begriff beta-Lysine, um sie von den hitzelabilen alpha-Lysinen (Antikörper und Komplement) abzugrenzen.

Dem Komplementsystem fällt als nicht spezifischem Abwehrsystem des Wirtes gegenüber gram-negativen Bakterien eine entscheidende Bedeutung zu. Dabei kann dieser Abwehrmechanismus über zwei verschiedene Wege ausgelöst werden (4).

Beim alternativen Weg führen mehrere proteolytische Aktivierungen von Komplementproteinen letzlich zur Bildung des die Membran angreifenden Komplexes (MAC), der aus den Komplementproteinen C5b, C6, C7, C8, C9 aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von über 2 000 000 hat. Dieser Weg der Komplementaktivierung ist streng negativ kontrolliert. Voraussetzung für die Bildung des MAC ist ein anderer Proteinkomplex, der unter normalen physiologischen Bedingungen äußerst unstabil ist. Seine Bindung an bestimmte bakterielle Oberflächenstrukturen führt zu einer mit einer Konformationsänderung verbundenen Stabilisierung des Komplexes und es kommt zum Ablaufen des alternativen Komplementweges. SCHREIBER konnte zeigen, daß für diesen Weg keine Antikörper notwendig sind, indem er mit elf gereinigten Komplementproteinen (C3, Faktor B, Faktor D, ß1H, C3b-Inaktivator, Properdin, C5, C6, C7, C8 und C9) die Komplementaktivierung rekonstruierte (5).

Im Gegensatz dazu ist der klassische Komplementweg antikörperabhängig. Es können aber nur IgM und einige Subklassen

von IgG an den Komplementfaktor C1 binden. Nach BORSOS und RAPP sind für die Bindung von C1 ein Molekül IgM bzw. zwei eng benachbarte IgG-Moleküle auf der Zelloberfläche ausreichend (6). Beim klassischen Weg der Komplementaktivierung führt die Bindung des Faktors C1q an den Fc-Teil des Antikörpers zur Konformationsänderung des C1-Komplexes und dadurch zur Umwandlung von Proenzymen zu aktiven Formen. Weitere damit verbundene Schritte führen zum Schluß zur Aktivierung von C5 zu C5b. Die Spaltung von C5 löst spontan in Form eines "Self-assembly-Prozesses" die Bildung des die Membran angreifenden Komplexes (MAC) aus. Ob über den alternativen oder über den klassischen Komplementweg oder über beide der MAC gebildet wird, ist bakterienstammspezifisch (7,8,9). Der MAC hat die Form eines Hohlzylinders und verhält sich nach Einlagerung in die Zellwand wie ein integraler Membranproteinkomplex. Es wird aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen angenommen, daß der MAC einen Kanal durch die Membran bildet (10). Für die Kanaltheorie spricht auch, daß mit dem Auftauchen des MAC in der Membran sich die Ionenpermeabilität durch die Lipiddoppelschicht sofort erhöht (11). Die Insertion des MAC in die äußere Membran bedingt eine Verdrängung von Membranlipid wie INOUE bei E. coli mit dem Nachweis von ins Medium freigesetztem Phospholipid und Lysophospholipid zeigen konnte (12,13). Bei Erythrozyten folgt die Komplement vermittelte Lyse einer "Ein-Treffer-Kinetik" (14). Die gram-negative Zelle stellt für die Komplementreaktion ein ungleich komplexeres System dar. Sie besitzt eine mehrschichtige Zellwand, und sie verfügt über Reparaturmechanismen um beschädigte Stellen an ihrer Hülle auszubessern. Daß der MAC auf die äußere und innere Membran von E. coli wirken muß um die Zellen abzutöten, zeigten FEINGOLD und Mitarbeiter indem sie plasmolysierte Zellen lysozymfreiem Serum aussetzten und keine bakterizide Wirkung des Serums finden konnten. Wurden die Zellen so lange in dem hypertonischen Medium gehalten bis sich die Bakterien von der Plasmolyse erholen konnten, so wurden die Zellen durch lysozymfreies Serum getötet (15). An der

Cytoplasmamembran hervorgerufener Schaden durch das Komplement bringt irreversibel den Zelltod.

Die Größe des hydrophoben Bereichs am MAC läßt bei gramnegativen Bakterien einen Kanal durch beide Membranen als unwahrscheinlich erscheinen. Es werden daher zwei Möglichkeiten des Komplementangriffes diskutiert:

a) Die Einlagerung des MAC in die äußere Membran zerstört diese unter Freisetzung von Phospholipid, und nachfolgender MAC kann in die Cytoplasmamembran integrieren (16).

b) Wirksame Schäden an den Zellen entstehen nur, wenn sich der MAC an den von BAYER (17) beschriebenen Adhäsionsstellen von äußerer und innerer Membran einlagert (18), was die Beschädigung beider Membranen zur Folge hat.

Die zweite Möglichkeit wird durch den Befund untermauert, daß nach Bindung des MAC an die äußere Membran kein zusätzlicher MAC für die Wirkung auf die Cytoplasmamembran erforderlich ist.

Der genaue Wirkungsmechanismus von dem in der Cytoplasmamembran inserierten MAC ist nicht bekannt. Zwar könnte der plötzliche Ausfluß von Kalium und Magnesium aus der Zelle den Zelltod durch Depolarisierung der Cytoplasmamembran verursachen. Diese Erklärung stünde dann in Analogie zur Wirkungsweise der Colicine A, E1, Ia, Ib und K (19), ist jedoch nicht ausreichend, wie der folgende Befund zeigt. Komplement, dem die Komponente C9 fehlt kann ebenfalls das Membranpotential der inneren Membran zerstören (20), jedoch ist die Lethalität von E. coli in C9 defizientem Serum nur etwa 3% von dem des Normalserums (21).

Obwohl empfindliche gram-negative Bakterien durch das Antikörper-Komplement-System getötet werden, ist nur in Anwesenheit von Lysozym eine spürbare Lyse der Bakterien zu beobachten (22). Wird Lysozym aus dem Serum durch Adsorption an Bentonit, einem Aluminiumsilikat (22,23) oder durch Anti-Human-lysozym Antikörper entfernt, so behält E. coli trotz der bak-

teriziden Wirkung des Serums seine Stäbchenform bei (16,24). Nachträgliche Zugabe von Lysozym in physiologischen Mengen führt zur Sphäroplastenbildung mit darauffolgender Lyse der Zellen (15,25). Die Kinetik und das Ausmaß der Lyse sind abhängig von der eingesetzten Lysozymmenge (22,24). Da Vorbehandlung von E. coli mit Lysozym keinen Einfluß auf eine nachfolgende Seruminkubation der Zellen hat muß angenommen werden, daß erst durch die Bildung eines funktionellen C5b-9 Komplexes in der äußeren Membran das Murein für Lysozym zugänglich wird (26,27).

Die Rolle des Lysozyms in der Komplement vermittelten bakterientötenden Reaktion ist sehr umstritten, da Serum auch in Abwesenheit von Lysozym gram-negative Bakterien abtötet, und mehrere Arbeitsgruppen in lysozymfreiem Serum keine Minderung der antibakteriellen Aktivität finden konnten (16,25).

Im Gegensatz dazu fanden GLYNN und MILNE, daß eine Neutralisierung von Lysozym mit Anti-Lysozym Antiserum oder die Entfernung des Lysozyms durch Bentonit aus dem Serum bei rauhen und glatten Stämmen von E. coli die Absterberate absinken läßt (24). Dieses Ergebnis konnten TAYLOR und KROLL bestätigen, indem sie in mit Anti-Lysozym Ig G behandeltem Serum eine geringe aber reproduzierbare Erniedrigung der Tötungsrate bei einem rauhen Stamm von E. coli fanden (9).

Die widersprüchlichen Resultate können durch die Problematik bei Verwendung von Bentonit als Lysozymadsorbens bzw. Hühnereiweißlysozym als Humanlysozymersatz in solchen Versuchen erklärt werden. Bentonit bindet nicht quantitativ und nicht spezifisch das Serumlysozym (28). Es werden in Tierseren auch Bakterizidine gegen gram-positive Bakterien (29), wie auch wesentliche Faktoren des alternativen Komplementwegs durch dieses Aluminiumsilikat gebunden. Theoretisch wäre aber auch eine Hemmung der Komplementaktivierung durch Antigen-Antikörper-Komplexe bei Zugabe von Anti-Lysozym Antikörper denkbar (NEISSER-WECHSBERG-Phänomen, 30). Eine Möglichkeit des Beitrags von Lysozym zur bakteriziden Wirkung des Serums könnte in der Lyse des als Barriere

fungierenden Mureins und der damit erleichterten Bildung des C5b-9 Komplexes an der Cytoplasmamembran bestehen.

Bei der Abwehr gram-positiver Bakterien ist die Bedeutung des Lysozyms als antibakterieller Faktor abhängig von der Herkunft des Serums. Human-, Hunde-, Rinder- und Meerschweinchenseren haben niedere Konzentrationen an beta-Lysinen, wohingegen die Seren aus Kaninchen und Ratten hohe Spiegel dieser Aktivität aufweisen. So ist im Kaninchenserum der wichtigste antibakterielle Faktor gegenüber B. subtilis nicht das Lysozym, sondern ein niedermolekulares, kationisches Protein (31,32,33). In Humanserum wird B. subtilis primär durch das Lysozym getötet (34).

Bei allen diesen Untersuchungen wurde Lysozym als einzige Mureinhydrolase des Serums betrachtet. Die Neutralisierung von Lysozym wurde gleichgesetzt mit dem Schutz des Mureinstützskeletts vor dem Serumangriff.

Versuche mit Phospholipase-Mutanten von E. coli wurden in der Absicht unternommen, den Beitrag der detergenzsensitiven und der detergenzresistenten Phospholipase bei der Komplementwirkung auf E. coli zu studieren. Nach Inaktivierung von Lysozym mit Antikörpern wurde in Humanserum eine weitere Mureinhydrolase nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Enzym charakterisiert. Eine Reinigung sollte hinsichtlich späterer Untersuchungen über den bakteriolytischen und bakteriziden Charakter dieser Mureinhydrolase versucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien, Proteine

Amersham:	^{3}H-Diaminopimelinsäure
Beckman:	Eichstandard zur Aminosäureanalyse
Behring:	komplettes Freundsches Adjuvans Humantransferrin Neuraminidase Rinderserumalbumin
Bio-Rad:	Proteinstandard für HPLC
Boehringer:	Lysozym aus Hühnereiweiß Phosphorylase A Ribonuclease
Difco:	Bacto-Agar Bacto-Tryptone Penassay-Broth Yeast-Extract
LKB:	Ultrogel AcA 34 Ultrogel AcA 44
Merz + Dade	Anti-Humanlysozym Ig G (Ziege) Anti-Ziegenantikörper Ig G (Kaninchen)
Miles:	alkalische Phosphatase Anti-Kaninchen Ig G (Ziege)

Pharmacia:	DEAE-Sephadex A 50
	Phenyl-Sepharose CL-4B
	Protein A-Sepharose CL-4B
	QAE-Sephadex A 50
	Sephadex G 50
	Sephadex G 100
	Sephadex G 200 superfine

Schleicher&Schüll: Säure gewaschenes Papier vom Typ SS 2040b

Serva:	Acrylamid
	3-Amino-9-äthyl-carbazol
	Äthylenglycol-bis-(2-aminomethyl)-N,N'-tetraacetat
	Carboanhydrase
	Coomassie Brilliant Blue G 250
	Desoxyribonuclease
	Fluram
	Merkaptoäthanol
	Myoglobin
	Orthophenanthrolin
	Ovalbumin
	Phenylmethylsulfonylfluorid
	Polyäthylenglykol 20 000
	N,N,N',N',-Tetramethyläthylendiamin
	Triton X-100
	Visking Dialysierschlauch
Sigma	p-Aminobenzamidin
	Chitin
	p-Chlormercuribenzolsulfonsäure
	Dithiothreitol
	Rinderserumalbumin
Whatman:	3 MM Papier
Zinsser:	Minivials
	Polyvials 714

Zinsser: Quickszint 402

N-Acetyl-glucosaminyl-(ß1-4)N-Acetyl-muramyl-Tetra-(Tri-)peptid und N-Acetyl-glucosaminyl-(ß1-4)1,6 Anhydro-N-acetyl-muramyl-Tetra-(Tri-)peptid wurden von J.V.Höltje MPI f. Virusforschung, Tübingen zur Verfügung gestellt.

Alle übrigen Chemikalien wurden analysenrein von Merck bezogen.

2.1.2. Nährmedien

Alle Angaben beziehen sich auf 1 Liter Medium, angesetzt mit deion. Wasser.

TY-Medium:	Bacto-Tryptone	8 g
	Yeast-Extract	5 g
	NaCl	5 g

TY-Plattenmedium: Zum Mediumansatz kommen 15 g Bacto-Agar hinzu.

Tryptonmedium:	Bacto-Tryptone	10 g
	NaCl	5 g

2.1.3. Bakterienstämme

Bezeichnung	Herkunft
E. coli K 12 W 3110	(35)
E. coli W 7 (dap, lys)	(36)
M. lysodeikticus	R. WERNER (Thomae)
B. subtilis	ATCC 6051
S. aureus	ATCC 6538

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung von Substrat für die Mureinhydrolasen

2.2.1.1. Isolierung von ^{3}H-Dap-markiertem Murein (37,38)

Mit 10 ml Übernachtkultur von E. coli W7 wurden 150 ml Tryptonmedium (mit 10 µg Dap/ml) angeimpft und bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Bei einer OD_{578} von 0,2 wurden die Bakterien geerntet und einmal mit Saline gewaschen. Die Zellen wurden wieder in Tryptonmedium aufgenommen (2 µg Dap/ml), zusätzlich mit 60 µCi ^{3}H-Dap (spez. Aktivität 40 Ci/mMol) suppliert und weiter bei 37°C geschüttelt. Nach Erreichen einer OD_{578} von 0,6 wurden die Bakterien geerntet, zweimal in Saline gewaschen, in 5 ml Wasser aufgenommen und dann langsam in 20 ml kochende 4%-ige NaDS-Lösung eingeleitet (15 Tropfen pro Min.).

Das Murein ließ sich aus der abgekühlten Lösung abzentrifugieren (40 000 x g, 60 Min., 15°C) und wurde zweimal in deion. Wasser gewaschen. Resuspension im Ultraschallbad und Zentrifugation erfolgten wie oben beschrieben.

Am Schluß wurden die Mureinsacculi 10 Min. bei 10 000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 10 ml PBS aufgenommen. Diese Suspension war die Substratlösung für die Messung von Mureinhydrolaseaktivität.

2.2.1.2. Isolierung von Murein-Lipoprotein-Komplex (38,39)

2g Bakterien (E. coli K 12 W 3110), die man aus einer 2 l Kultur bei einer OD_{578} von 0,5 - 0,6 geerntet hatte, wurden mit deion. Wasser auf ein Volumen von 7 ml aufgefüllt, 18 g Glasperlen (0,17 - 0,18 mm Ø) und je 0,2 mg Ribonuclease und Desoxyribonuclease zugesetzt. Die Zellaufschluß erfolgte durch Schütteln der Mischung in einer Schwingmühle (Vibro-

gen, E. Bühler) bei 4°C (5000 - 6000 Schwingungen pro Min., 6 Min. lang).

Die Glasperlen wurden mit einer Filternutsche G2 abgetrennt und mit 20 ml deion. Wasser nachgewaschen. Zum Filtrat wurden 4,5 ml 0,1 M EDTA pH 8,0 zugegeben und mit deion. Wasser auf 45 ml aufgefüllt. Die Zellmembranen wurden durch Zentrifugation (20 000 x g, 90 Min.) sedimentiert, der Niederschlag mit dem Ultraschall-Stab (Branson Sonifier) in 45 ml Wasser resuspendiert und wieder zentrifugiert (20 000 x g, 60 Min.). Der Waschvorgang wurde einmal wiederholt und das Sediment schließlich in 10 ml Wasser aufgenommen. Alle bisherigen Reinigungsschritte wurden bei 4°C ausgeführt.

Die Suspension wurde mittels einer Schlauchpumpe (Peristaltic Pump P3, Pharmacia) bei einer Förderleistung von 20 ml/Std. in 50 ml kochende NaDS-Lösung eingeleitet.
Aus der Lösung wurde das Mureinlipoprotein abzentrifugiert (100 000 x g, 1 Std., 15°C) und das klare Sediment zweimal mit Wasser gewaschen. Danach wurde das Mureinlipoprotein in 2 ml Wasser aufgenommen und nach Zugabe von einem Tropfen Chloroform bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1.3. Präparation von lipoproteinfreiem Murein

Die in 2.2.1.2. erhaltene Mureinlipoproteinsuspension (2 mg) wurde in Tris-Puffer aufgenommen (Endkonzentration 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5) und nach Zugabe von 50 µg Proteinase K 90 Min. lang bei 55°C inkubiert. Die Einleitung der Suspension in NaDS und die Isolierung des lipoproteinfreien Mureins erfolgte auf die gleiche Weise wie es in 2.2.1.2. für das Mureinlipoprotein beschrieben ist.

2.2.1.4. Isolierung von Murein aus M. lysodeikticus

Die Gewinnung des Mureins erfolgte analog der in 2.2.1.2 für E. coli beschriebenen Methode. Als einzige Abweichung wurde der Zellaufschluß im Vibrogen auf 12 Min. ausgedehnt.

2.2.2. Messung von Mureinhydrolaseaktivität mit ^{3}H-Dap-markierten Murein-Sacculi als Substrat

10 µl Substratlösung aus 2.2.1.1. wurden mit 20 µl Enzymlösung und 90 µl Puffer (PBS pH 7,3 oder 0,1 M Tris/HCl pH 8,0) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß unter starkem Schütteln (Gyrotory Waterbath-Shaker Model G 75 , New Brunswick Scientific) bei 37°C für 15 Min. inkubiert.

Nach zehnminütigem Zentrifugieren (Eppendorf-Zentrifuge) wurden 100 µl Überstand aus den Reaktionsgefäßen entnommen, mit 200 µl Wasser und 3ml Scintillationsflüssigkeit vermischt und im Scintillationszähler (Mark II Liquid Scintillation System, Nuclear Chicago oder Betaszint BF 5 000, Berthold) die Radioaktivität gemessen.

Die Zählausbeute - abzüglich dem cpm-Wert von Substratlösung inkubiert mit Puffer ohne Enzym - ergab ein Maß für die Größe der Hydrolaseaktivität in der Enzymlösung.

Volumina von Substratlösung, Enzymlösung, Puffer und die Inkubationsdauer wurden je nach Problemstellung variiert.

2.2.3. Inaktivierung von Humanlysozym durch Antikörper aus Ziegen

Das Serum wurde fünzigfach verdünnt und mit der angegebenen Antikörpermenge vermischt, eine halbe Stunde bei RT stehen gelassen und 5 Min. in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert.

Mit dem Überstand wurden Hydrolaseaktivitätsmessungen durchgeführt.

2.2.4. Inaktivierung von Humanlysozym durch zweite Antikörper

Nach 10 Min. Vorinkubation der Serumverdünnung mit Anti-Humanlysozym aus Ziegen wurde das Ziegen Ig G mit dagegen gerichteten Antikörpern aus Kaninchen gefällt und nach weiteren 20 Min. wie in 2.2.3. zentrifugiert.

2.2.5. Proteinbestimmung mit Fluram (40,41)

10 µl bis 100 µl Proteinlösung wurden mit Lösung A auf 1,5 ml (0,5 M Natriumborat pH 9) aufgefüllt und unter heftigem Schütteln auf dem Vortex mit 0,5 ml Lösung B (30 mg Fluram in 100 ml getrocknetem Dioxan) gemischt.

Nach 10 - 60 Min. wurde die Fluoreszenz gemessen (Eppendorf-Photometer 1101 M mit Fluoreszenz-Zusatz 1030).

Anregungsbereich: 405 - 436 nm, Meßbereich: 470 - 3 000 nm.

Für die Erstellung der Eichkurve wurde 5 - 160 µg Rinderserumalbumin eingesetzt.

2.2.6. Proteinbestimmung mit Coomassie-Blue (42,43)

Diese von BRADFORD beschriebene Methode besitzt gegenüber der Flurammethode den Vorteil der geringeren Störanfälligkeit. Sie fand daher Anwendung bei der Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Tris-gepufferten Lösungen.

Reagenz: 100 mg Coomassie-Blue G 250
50 ml 95% Äthanol
100 ml 85% (w/v) Orthophosphorsäure
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

3 ml von diesem Reagenz wurden mit 20 - 150 µl Proteinlösung gut gemischt und nach 10 - 60 Min. die Extinktion bei 595 nm gemessen.

Die Eichung erfolgte mit 3 - 40 µg Rinderserumalbumin.

2.2.7. Aminosäureanalysen

Protein, Peptid oder Murein wurde in 6 N Salzsäure aufgenommen, unter Stickstoff in Glasampullen eingeschmolzen und 18 Std. bei 105°C erhitzt.

Die Salzsäure wurde im Wasserstrahlvakuum abdestilliert, der Rückstand in ein wenig Wasser aufgenommen und wieder bis zur Trockene eingeengt.

Nach Aufnehmen der Hydrolyseprodukte in Citratpuffer (0,18 N Natriumcitrat pH 2,2) wurde der Probeninhalt mit einem Aminosäureanalysator LC 6005 (Biotronik) untersucht. Ein angeschlossener Rechner (System I Computing Integrator, Spectra Physics) druckte die jeder Aminosäure (Aminozucker) zugehörige Fläche unter der Chromatogrammkurve aus. Anhand von Vergleichsanalysen eines Standardgemischs ließen sich über die Flächenwerte die Aminosäuren (Aminozucker) quantitativ bestimmen.

Bei dieser sauren Hydrolyse konnten die Aminosäuren Tryptophan, Methionin und Cystein nicht erfaßt werden. Asparagin und Glutamin wurden als Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure vorgefunden.

2.2.8. NaDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese (44,45)

Die Anreicherung der Amidase wurde in der analytischen PAGE verfolgt. Verwendet wurde eine Flachgelapparatur (Bio Rad) mit den Abmessungen 100 mm x 14 mm. Die Gelstärke betrug 0,75 mm. Das Gel wurde bei konstanter Stromstärke von 15 mA/cm² (Netzgerät 2103, LKB) gefahren. Es ergab sich eine Laufzeit von 4 Std.

Gelzusammensetzung:

(für alle Lösungen wurde deion. dest. Wasser verwendet)

Acrylamidlösung I : 44,4 g Acrylamid, 0,8 g Bisacrylamid auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.

Acrylamidlösung II: 30,0 g Acrylamid, 0,8 g Bisacrylamid mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Trenngelpuffer: 0,75 M Tris/HCl pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0,25 M Tris/HCl pH 6,8

Trenngelmischung:	Acrylamidlösung I	6,25 ml
	Trenngelpuffer	12,5 ml
	Wasser	5,12 ml
	frisches Ammoniumpersulfat (10 mg/ml)	0,63 ml
	10% (w/v) NaDS	0,5 ml
Sammelgelmischung:	Acrylamidlösung II	2,5 ml
	Sammelgelpuffer	12,5 ml
	Wasser	9,13 ml
	frisches Ammoniumpersulfat (10 mg/ml)	0,63 ml
	10% (w/v) NaDS	0,25 ml

Elektrodenpuffer: 4,55 g Tris, 21,65 g Glycin, 1,5 g NaDS wurden mit Wasser auf 1,5 l aufgefüllt.

Auftragspuffer: (doppelt konzentriert)
- 0,125 M Tris/HCl pH 6,8
- 4% NaDS (w/v)
- 20% Glycerin (v/v)
- 10% Mercaptoäthanol (v/v)
- 0,005% Bromphenolblau (w/v)

Durchführung: Die Trenngelmischung wurde bei 4°C im Wasserstrahlvakuum 6 Min. entgast, 50 µl TEMED beigemischt und 11 ml dieser Lösung mit einer Pipette zwischen die Glasplatten der Elektrophoresevorrichtung gegossen.

Das Überschichten des Trenngels mit Butanol(-2) während der Polymerisierung führte zu einer glatten Oberfläche. Nach Abgießen des Butanols wurde das Trenngel mit 2 - 3 ml der entgasten (6 Min.) und mit 50 µl TEMED versetzten Sammelgelmischung überschichtet. Nach 1 Std. war das Gel polymerisiert und gebrauchsfertig.

Proben in wäßriger Lösung wurden mit gleichem Volumen doppelt konzentriertem Auftragspuffer gemischt, 5 Min. gekocht und nach Zentrifugation (2 Min., Eppendorfzentrifuge) in die Taschen des Sammelgels gefüllt.

2.2.9. Anfärben von Polyacrylamidgelen

2.2.9.1. Nachweis durch Coomassie Blue (46)

Zur Anfärbung der Proteine im Gel wurde eine nach FAIRBANKS vereinfachte Methode angewandt. Die Gele wurden mindestens 4 Std. in Lösung 1 gefärbt und anschließend für über 12 Std. in Lösung 2 entfärbt.

Lösung 1: 10% (v/v) Essigsäure
25% (v/v) Isopropanol
0,03% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250

Lösung 2: 10% (v/v) Essigsäure

2.2.9.2. Nachweis durch Silbernitrat (47)

Diese Anfärbemethode für Proteine besitzt im Vergleich mit 2.2.9.1. eine wesentlich höhere Empfindlichkeit.

Mit dem Gel wurde wie folgt verfahren:

Schritt 1: Vorfixierung des Gels in 50% (v/v) Methanol/ 10% (v/v) Essigsäure für 30 Min. und in 5% (v/v) Methanol/7% (v/v) Essigsäure für 30 Min.

Schritt 2: 30 Min. lang wurde das Gel in 10% (v/v) Glutaraldehyd fixiert.

Schritt 3: Waschen des Gels für mindestens 2 Std. in deion. Wasser (Wasser wurde mehrmals erneuert).

Schritt 4: Inkubation in Dithiothreitol (5 µg/ml) für 30 Min.

Schritt 5: Behandlung des Gels in 0,1% (w/v) Silbernitratlösung für 30 Min.

Schritt 6: Nach kurzem Waschen mit deion. Wasser wurde das Gel zweimal mit Entwickler (50 µl 35% (v/v) Formaldehyd pro 100 ml 3% (w/v) Natriumcarbonatlösung) gewaschen und anschließend im Entwickler inkubiert bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

Die Entwicklung wurde durch Citronensäure gestoppt (5 ml 2,3 M Citronensäure je 100 ml Entwickler).

Nach 10 Min. wurde das Gel gewässert und zur Verhütung des Ausbleichens der Proteinbanden 10 Min. in 0,03% (w/v) Natriumcarbonatlösung inkubiert.

2.2.9.3. Nachweis von Glykoproteinen (48)

Um Glykoproteine auf dem Gel anzufärben wurde folgendes Verfahren angewandt:

Schritt 1: Das Gel wurde zweimal in 300 ml 10% (v/v) Essigsäure/ 40% (v/v) Äthanol 30 Min. lang fixiert.

Schritt 2: Es folgte eine Oxidation in 100 ml 10% (v/v) Essigsäure/ 1,5% (v/v) Perjodsäure für 1 - 2 Std..

Schritt 3: Danach wurde das Gel dreimal in je 100 ml 10% (v/v) Essigsäure/0,4% (w/v) Natriumbisulfit für 5 Min. gewaschen. Das Gel war nun völlig entfärbt.

Schritt 4: Nun wurden in 50 - 100 ml Schiff's Reagenz die Proteinbanden angefärbt.

Schritt 5: Nach 1 - 2 Std. wurde das Gel in 300 ml 45% (v/v) Äthanol (vorgekühlt) in kaltem Leitungswasser für 1 - 2 Std. entwickelt.

2.2.10. Behandlung von osmotisch geschockten Zellen mit Amidase

Methode 1: ohne EDTA (49)

E. coli K 12 wurde in einer 100 ml Schüttelkultur in M3-Medium bis zu einem Titer von 5 X 10^8 Zellen/ml gezüchtet, die Zellen abzentrifugiert und das Sediment in 8 ml Puffer 0,01 M Tris/HCl pH7, 0,03 M NaCl) suspendiert. Die Zellen wurden wieder abzentrifugiert und der Waschvorgang wiederholt.

Dann wurden die Zellen in 4,5 ml 33 mM Tris/HCl pH 7 aufgenommen und je 1 ml auf 4 Reagenzgläser verteilt. In zwei Gläser wurde unter heftigem Schütteln 1 ml 40% (w/v) Saccharoselösung in 33 mM Tris/HCl pH 7 zu den Zellen gegeben, in die anderen beiden Gläser nur Puffer (33 mM Tris/HCl pH 7). Bis hierher wurde bei Raumtemperatur gearbeitet.

Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und in je ein Glas von mit und ohne Saccharose behandelten Zellen 2 ml eisgekühlte $MgCl_2$-Lösung gegeben, in welcher 0,5 mg Amidase-Fraktion (präpariert über QAE A 50 Sephadex) gelöst waren. In den beiden anderen Reagenzgläsern wurden die Zellen nur in 2 ml 0,5 mM $MgCl_2$-Lösung aufgenommen.

Nach Inkubation von 15 Min. im Eisbad wurde mit PBS verdünnt und auf TY-Agarplatten auf Überlebende ausplattiert.

Methode 2: mit EDTA (50)

Die Zellen wurden in M3-Medium hochgezogen und bei einer OD_{578} von 0,5 je Ansatz 17,5 ml dieser Kultur abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in 4 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8 resuspendiert und nach Zugabe von 4 ml 1 M Saccharose in 0,2 M Tris/HCl pH 8 für 2 Min. auf Eis gestellt.

Danach wurden 40 µl 0,1 M EDTA pH 7,5 und 0,45 ml Amidase-Fraktion (3 mg/ml) zugemischt. Im Kontrollexperiment wurde die Amidaselösung durch PBS ersetzt.

Gleich nach der Amidasezugabe wurden unter Schütteln (Vortex-Genie, Bender und Hobein) 8,5 ml deion. dest. Wasser zugegeben.

Von der gut durchmischten Suspension wurde 1 ml in eine auf 37°C geheizte Küvette im automatischen Küvettenwechsler eines Eppendorf-Photometers pipettiert und die Abnahme der OD_{546} mit einem Schreiber aufgezeichnet.
Von der ebenfalls bei 37°C inkubierten Restsuspension wurde nach 10 bzw. 16 Min. eine Probe entnommen und über Verdünnungsausstriche die Lebendzellzahl bestimmt.

2.2.11. Test der Amidasewirkung auf gram-positive Bakterien

2.2.11.1. Lebendzellzahlbestimmung

Der zu testende Bakterienstamm wurde in der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und davon 2,5 x 10^7 Zellen in 0,5 ml PBS mit 0,2 ml Amidaselösung (präpariert über QAE A50, 3 mg/ml Protein) 1 Std. bei 37°C inkubiert.

Die Lebendzellzahl wurde durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe bestimmt.

2.2.11.2. Spottest (51)

TY-Agarplatten wurden mit 3 ml TY-Top-Agar überschichtet, der etwa 10^8 Zellen des Teststammes enthielt. Auf den erstarrten Top-Agar wurden 10 bzw. 20 µl Amidaselösung gegeben.

Die Platten wurden nach Eintrocknen der Flüssigkeit bei 37°C über Nacht inkubiert. Empfindlichkeit der Zellen führt zur Bildung eines Lysehofes.

2.2.12. Papierchromatographie (52,53)

Laufsysteme: A) Isobuttersäure - 1 M Ammoniumhydroxid (5 : 3)

B) n-Butanol - Eisessig - Wasser (4:1:5)
(davon wurde die Oberphase genommen)

Muropeptide wurden in den beiden Systemen absteigend chromatographiert entweder auf Whatman 3 MM-Papier für 18 Std. (System A) oder auf säuregewaschenem SS 2040b-Papier von Schleicher und Schüll (System B) zwischen 18 und 27 Std..

Bei radioaktiv markierten Muropeptiden wurde das Papier nach der Chromatographie getrocknet und die Laufspuren in 2 cm breite (System A) bzw. 1 cm breite (System B) Streifen geschnitten.

Die bei 60°C für eine Std. getrockneten Papierstreifen wurden mit 300 µl Wasser in 3 ml Quickszint 402 aufgenommen und im Scintillationszähler auf Radioaktivität untersucht.

Bei präparativer Trennung von Mureinspaltstücken wurden Aliquots von den untersuchten Proben auf Parallelspuren aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das getrocknete Papier mit den Indikatorspuren durch eine Ninhydrinlösung (0,25% (w/v) Ninhydrin in Aceton) gezogen, wieder getrocknet und 10 Min. bei 120°C entwickelt. Durch diese Anfärbung konnten die Laufstrecken der einzelnen Komponenten bestimmt werden.

Vom nicht gefärbten Teil des Chromatogramms wurden anhand der zuvor bestimmten Laufstrecken die mutmaßlichen Komponenten ausgeschnitten und mit Wasser aus dem Papier extrahiert. Anschließend wurden die Proben im Rotationsverdampfer eingeengt, wie in 2.2.7. beschrieben in 6 N HCl hydrolysiert und durch Aminosäureanalyse Menge und Zusammensetzung der Mureinspaltprodukte untersucht.

2.2.13. Reinigung der Amidase

2.2.13.1. Gewinnung von Serum

Aus frischem, heparinisiertem Blut wurden durch Zentrifugation bei 2 000 UpM, 15 Min. und 4°C (Minifuge, Christ) die zellulären Bestandteile des Blutes entfernt. Das Serum wurde portionsweise bei -70°C eingefroren.

2.2.13.2. Serumvorbereitung für Ionenaustauschchromatographie

80 ml gefrorenes Serum wurden bei RT aufgetaut und im Dialyseschlauch (Ausschlußvolumen MG 14 000) über Nacht bei 4°C gegen 2 l Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,9, 5 mM $MgCl_2$, 0,1 mM PMSF, 0,025% NaN_3) dialysiert. Die Entfernung von ausgefallenem Protein erfolgte durch Zentrifugation des Serums bei 5 000 x g für 10 Min..

2.2.13.3. Säulenchromatographische Methoden

Alle Arbeiten erfolgten bei 4°C. Die Säulen wurden mit einer Peristaltic Pump 3 (Pharmacia) betrieben, die Fraktionen mit einem Fraktionssammler (Model 328, Isco) nach Zeit gesammelt. Der Elutionsvorgang wurde durch Messung der Absorption bei 254 bzw. 280 nm verfolgt (Absorbance Monitor Model UA-5, Isco).

2.2.13.3.1. Reinigung mittels DEAE-Sephadex A 50

Eine 50 cm lange Säule (Bio-Rad) mit einem Bettvolumen von 100 ml wurde mit DEAE-Sephadex A 50 Anionenaustauscher (Pharmacia) gefüllt und mit Säulenpuffer äquilibriert. Nach Aufpumpen des dialysierten Serums (2.2.13.2.) wurde die Säule mit 150 ml Säulenpuffer gespült und ein linearer 500

ml Gradient (Gradientenformer GM-1, Pharmacia) von 0 bis 0,1 M NaCl angelegt. In 9 ml großen Fraktionen wurde das Eluat bei einer Förderleistung von 6 ml/Std. gesammelt und auf Hydrolaseaktivität getestet. Lysozym band nicht an diesen Ionenaustauscher und lief direkt durch die Säule. Nach 200 ml Gradient wurde das Enzym eluiert. Die amidasehaltigen Fraktionen wurden mit PAGE und Proteinbestimmung weiter charakterisiert und danach gepoolt.

Säulenpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,9, 5 mM $MgCl_2$, 0,1 mM PMSF, 0,025% NaN_3

2.2.13.3.2. Reinigung mittels QAE A 50 Sephadex

Das Verfahren entsprach hier dem in 2.2.13.3.1. für DEAE A 50 beschriebenen. Die einzige Abweichung bestand darin, daß mit einem NaCl-Gradienten von 0 - 300 mM das Enzym von der Säule eluiert wurde.

2.2.13.3.3. Reinigung durch Gelfiltration

G-200 superfine Sephadex:

Die zu reinigenden Proben (4 - 7 ml) wurden in 15% Glycerin aufgenommen und durch Unterschichten auf eine K 26 Säule von Pharmacia aufgetragen.

Säulendaten: Querschnitt 5,3 cm^2, Füllhöhe 63 cm, Ausschlußvolumen 150 ml.

Die Fördermenge betrug 5,3 ml/Std., die Fraktionsgröße 8 ml. Die einzelnen Fraktionen wurden im Enzymtest (2.2.2.) und durch PAGE (2.2.8.) untersucht.

Puffer: 20 mM Natriumphosphat pH 7,3, 0,1 M NaCl

G-100 Sephadex:

Bis zu 3 ml Probe mit 15% Glycerin wurden durch Unterschichten auf eine K 16 Säule aufgetragen (Pharmacia).

Säulendaten: Querschnitt 2 cm², Füllhöhe 90 cm, Ausschlußvolumen 60 ml.

Die Förderleistung der Pumpe betrug 12 ml/Std., die Fraktionsgröße 4 ml.

Puffer: 20 mM Natriumphosphat, 0,1 M NaCl

Ultrogel AcA 34, Ultrogel AcA 44:

Bei einem Bettvolumen von 320 ml und 5,3 cm² Querschnittsfläche betrug die Förderleistung 30 ml/Std., die Fraktionsgröße 5 ml. Das Ausschlußvolumen lag bei 120 ml. Es wurde mit PBS pH 7,3 eluiert. Es wurde nicht mehr als 7 ml Probe auf die Säule aufgetragen.

2.2.13.3.4. Reinigung mittels einer Phenylsepharosesäule

Die Auftrennung wurde durchgeführt mit einer K 15 Säule (Pharmacia), die 1,77 cm² Querschnittsfläche und ein Bettvolumen von 46 ml hatte. Zur Äquilibrierung der Säule wurde 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,3 mit 0,8 M Ammoniumsulfat und 0,01% Natriumazid verwendet.

Die Flußgeschwindigkeit betrug 20 ml/Std..

5 ml Probe wurden mit Ammoniumsulfat auf eine Molarität von 0,8 eingestellt und auf die Säule gepumpt. Dann wurde die Säule mit 1 - 2 Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer gewaschen und danach ein linearer Gradient mit abnehmender Ionenstärke angelegt:

Puffer 1: 0,8 M Ammoniumsulfat, 10 mM Natriumphosphat, 0,01% Natriumazid (120 ml)
Puffer 2: 120 ml 10 mM Natriumphosphat, 0,01% Natriumazid

Nach Durchlaufen des Gradienten wurde mit deion. dest. Wasser von der Säule eluiert.

2.2.13.4. Enzymreinigung mittels FPLC-System

In diesem Falle erfolgte die Reinigung der Amidase mit einem Mono Q Anionenaustauscher (Pharmacia). Das System wurde von einer HPLC-Pumpe (Kontron) betrieben. Mit einem Niederdruck-Dossier-Gradientenformer Modell 250 B (Gynkotek) wurde der Gradient gebildet. Der Gradientenverlauf ist aus Abb. 1 ersichtlich. Das Totvolumen (bestehend aus der Zuleitung vom Gradientenformer zur Pumpe und dem Volumen der Auftragsschlaufe) vom Gradientenformer zur Säule betrug 3 ml.

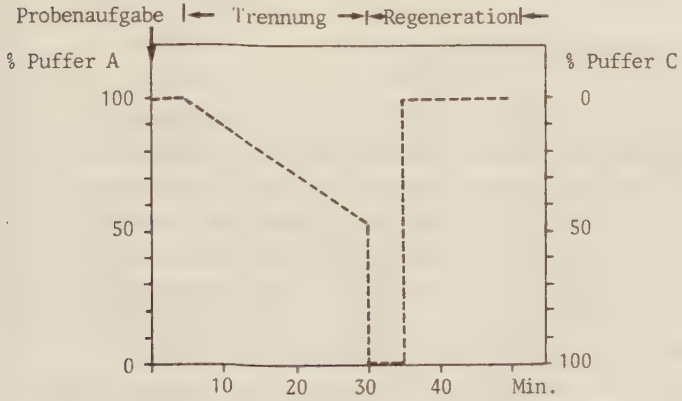


Abb. 1: Schema für das Trennprogramm mit einem Mono Q Anionenaustauscher.

Aufgespritzt wurden 50 µg - 2 mg Protein in einem Volumen von bis zu 2 ml. Durch Verdünnen der aufzutragenden Proben mit Wasser wurde erreicht, daß die Molarität der Probenlösungen nicht höher war als die des A-Puffers.
Es wurde mit zwei halogenidfreien Puffersystemen gearbeitet, die in etwa die gleiche Trennleistung für diese Problemstellung erbrachten.

System I
Puffer A: 20 mM Triäthanolamin/Essigsäure pH 7,5
Puffer B: 20 mM Triäthanolamin/Essigsäure pH 7,5, 0,8 M Natriumacetat.

System II

Puffer A: 50 mM N-Methyldiäthanolamin/Essigsäure pH 8

Puffer B: 50 mM N-Methyldiäthanolamin/Essigsäure pH 8, 0,8 M Natriumacetat.

Die Flußrate betrug 0,5 ml/Min.. Dabei baute sich ein Säulendruck von 10 Atmosphären auf. Der Trennungsvorgang wurde photometrisch (Uvikon 725 , Kontron) bei 280 nm verfolgt und das Elutionsprofil von einem Integrator mit Schreiber aufgezeichnet (HP 3390 A, Hewlett Packard). Die Fraktionierung wurde von Hand ausgeführt, indem die Gipfel einzeln gesammelt wurden.

2.2.14. Substratreinigung über HPLC

Die Auftrennung der Abbauprodukte von Mureinlipoprotein nach Amidasebehandlung erfolgte zum Nachweis der Lipoproteinabspaltung vom Murein mit einer HPLC-Säule TSK 250 (Bio-Rad). Die Säule hatte eine Länge von 30 cm und wurde von einer 7,5 cm langen Vorsäule geschützt. Es wurden 10 - 100 µg Protein in 10 - 100 µl Lösung aufgespritzt. Bei einer Fördermenge von 1 ml/Min. (Druck 15 at) wurde mit einem 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,8 mit 50 mM bzw. 1 M Natriumsulfat eluiert. Der Elutionsverlauf wurde bei 230 nm gemessen und aufgezeichnet (HP 3390 A, Hewlett Packard). Geeicht wurde die Säule mit je 100 µg der Substanzen Thyroglobulin, Immunglobulin G, Ovalbumin, Myoglobin und Cobalamin (Standard, Bio-Rad).

Das Protein in den von Hand fraktionierten Gipfeln wurde gegen Wasser dialysiert, in 6 N HCl hydrolysiert und anschließend mit dem Aminosäureanalysator untersucht (vgl. 2.2.7).

2.2.15. Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität

Von ^{3}H-Dap-markiertem N-Acetyl-glucosaminyl(ß1-4)-1,6-Anhydro-N-acetyl-muramyl-Tri-(Tetra-)peptid wurde über Aminosäureanalyse die Konzentration dieser Mureinkomponente bestimmt und nach Messen der Radioaktivität von einer Probe dieses Substrats die spezifische Markierung errechnet.

Für die Aktivitätsbestimmung wurde folgender Ansatz gemacht:

Je 1,7 nMol Substrat in 20 µl Lösung wurden nach Zugabe von 10 µl Enzym 10 Min. bei 37°C inkubiert. Substrat und Enzym waren in 50 mM Tris/HCl pH 8,9 mit 10 mM $MgCl_2$ gelöst. Die Reaktion wurde durch 5-minütiges Erhitzen der Ansätze auf 100°C gestoppt.

Die Proben wurden papierchromatographisch aufgetrennt und nach 2.2.12. wurde damit weiter verfahren.

Der Substratumsatz konnte über die Radioaktivität des vom Substrat abgespaltenen Peptids bestimmt werden. Daraus wurde die Aktivität errechnet und zwar entsprach 1 µMol Substratumsatz pro Min. einer Enzymeinheit.

Bei der spezifischen Aktivität wurden die Enzymeinheiten pro mg Protein bestimmt.

2.2.16. pH-Optimum der Amidase

2.2.16.1. ^{3}H-Dap-N-Acetyl-glucosaminyl(ß1-4)-1,6-Anhydro-N-acetyl-muramyl-Tri-(Tetra-)peptid (= X/X') als Substrat

20 µl Enzymlösung wurden mit 30 µl Substratlösung und 20 µl Universalpuffer nach Britton-Robinson (54) 10 Min. bei 37°C inkubiert, die Reaktion durch 5-minütiges Erhitzen auf 100°C gestoppt, die Proben eingefroren, lyophilisiert, in einem kleinen Volumen Wasser aufgenommen und papierchromatographiert (vgl. 2.2.12.).

Britton-Robinson-Universalpuffer:

40 mM Orthophosphorsäure, 40 mM Essigsäure, 40 mM Borsäure Der pH-Wert wurde mit Natronlauge eingestellt.

Über die Radioaktivität des nach Spaltung von X/X' entstandenen Peptids wurde die Enzymaktivität bestimmt (vgl. 2.2.12.).

2.2.16.2. ^{3}H-Dap-Murein-Sacculi als Substrat

Inkubationsansatz:

70 µl Britton-Robinson-Universalpuffer + 30 µl Enzym (nach DEAE A 50 Ionenaustauschchromatographie 1 : 10 in Wasser verdünnt) + 10 µl 20 mM $MgCl_2$ + 10 µl ^{3}H-Dap-Mureinlösung.

Es wurde 30 und 90 Min. bei 37°C unter heftigem Schütteln inkubiert. Die Proben wurden danach abzentrifugiert (12 000 x g) und in 100 µl Überstand die cpm bestimmt.
Der Ansatz mit der größten Freisetzung von ^{3}H-Dap wurde als 100% relative Enzymaktivität gesetzt.

2.2.17. Molekulargewichtsbestimmung der Amidase

Die für diese Bestimmung verwendeten G-100 und G-200 sf Sephadex Säulen wurden betrieben wie in 2.2.13.3.3. ausgeführt.

Bei G-100 Sephadex wurden 1 mg RSA, 1 mg Ovalbumin, 0,8 mg Chymotrypsinogen A und ca. 100 µg vorgereinigtes Enzym gelöst in 1 ml auf die Säule gegeben.

Bei G-200 sf Sephadex waren es 1,5 mg Humantransferrin, 3 mg RSA, 3 mg Ovalbumin, 2 mg Chymotrypsinogen A und ca. 200 µg vorgereinigte Enzymfraktion in 1,3 ml Auftragsvolumen.

Die Elutionswerte der Eichproteine wurden über die Extinktion bei 254 nm und einer Empfindlichkeit von E= 0,1 gemessen, die des Enzyms über die Hydrolaseaktivität bestimmt.

2.2.18. Immunchemische Methoden

2.2.18.1. Gewinnung von Antigen

5 mg Amidaselösung (nach Reinigung über eine DEAE A 50 Sephadex Säule) wurde auf zwei Polyarcrylamidgelen von 1,5 mm Stärke aufgetrennt. Die vermutliche Enzymbande wurde nach Färben (Coomassie Blue) und ausgiebigem Wässern des Gels ausgeschnitten, eingefroren und lyophilisiert.

2.2.18.2. Gewinnung des Antiserums

Die getrocknete Gelbande aus 2.2.18.1. wurde mit einem Pistill im Mörser pulverisiert und in drei gleiche Portionen aufgeteilt für drei Immunisierungen eines Kaninchens.

Eine Emulsion aus 1 ml wäßriger Gelsuspension und 1 ml komplettem Freundschem Adjuvans wurde zu gleichen Teilen in 8 Hautfalten entlang einer gedachten Linie zwischen Achselhöhle und Leiste injiziert. Zweit- und Drittimmunisierung erfolgten im Abstand von je 12 Tagen. Nach der dritten Immunisierung wurden ca. 20 ml Blut aus der Ohrvene entnommen, das Serum nach Gerinnung (4°C über Nacht) abgetrennt und in 1 ml Portionen bei -70°C gelagert.

2.2.18.3. Antikörperreinigung

2 ml Serum wurden auf eine mit Protein A-Sepharose gefüllte Säule von 1,5 ml Bettvolumen und 8 cm Höhe gepumpt. Danach wurde die Säule mit 20 ml PBS pH 7,3 , 0,1% NaN_3 gewaschen. Das Ig G wurde mit 0,1 M Essigsäure eluiert, in 1 ml großen Fraktionen aufgefangen und sofort durch Zugabe einer entsprechenden Menge von 2 M Tris neutralisiert.

Die Pumpe hatte eine Förderleistung von 2 ml/Std.

Die antikörperhaltigen Fraktionen wurden über Proteinbestimmung und PAGE identifiziert.

2.2.18.4. Untersuchung der Spezifität des Antiserums - "Gelblotting" (55,56)

Auf allen Spuren einer PAGE nach LUGTENBERG wurde vorgereinigte Amidase von der gleichen Präparation wie in 2.2.18.1. elektrophoretisch getrennt.

Danach wurde das Gel kurz mit deion. Wasser gespült, 15 Min. im Blot-Puffer gewaschen und darauf eine Nitrocellulose-Folie aufs Gel gelegt. Auf einen Scotch britt Schwamm (3M) wurde 3 MM Filterpapier(Whatman) gelegt und darüber geschichtet in der Reihenfolge Gel mit Nitrocellulose, 3 MM Papier, Scotch britt. Dann wurde das Ganze fixiert und in eine mit Blot-Puffer gefüllte Kammer gegeben (Trans-blot-cell, Bio-Rad). Durch Anlegen einer Spannung von 36 V bei 4°C wurde in 3 Std. das Protein vom Gel auf die Nitrocellulose-Folie geblottet.

Ein 2 cm breiter Streifen der Folie wurde angefärbt, um den erfolgreichen Blot-Vorgang nachzuweisen.

Verfahren: 1) Nitrocellulose-Folie mit 0,05% Amidoschwarz in 7% Essigsäure 3 Min. färben.

2) 30 Min. mit 7% Essigsäure entfärben.

Der andere Teil der Nitrocellulose wurde bei RT 1 Std. mit 1% RSA in PBS inkubiert und danach dreimal mit PBS gespült. Die Nitrocellulose-Folie wurde parallel zur Elektrophoreselaufrichtung in 6 gleichgroße Streifen geschnitten . Je drei Verdünnungen (1:20, 1:100, 1:500) von Antiserum und Nullserum (Kaninchenserum vor der Immunisierung) wurden 1 Std. mit diesen Streifen bei RT inkubiert.

Die Serumverdünnungen wurden in PBS mit 0,1% Triton X-100 ausgeführt.

Anschließend wurden die Nitrocellulose-Streifen 3 x 10 Min. im selben Puffer gewaschen und 1 Std. bei RT mit an Protein A gekoppelter Peroxidase (60 µl Protein A-Peroxidase-Stammlösung auf 2 ml PBS mit 0,1% Triton) inkubiert. Die Streifen wurden dann fünfmal mit PBS/Triton gewaschen und mit Filterpapier trocken getupft.

Die Nitrocellulose-Streifen wurden auf das frisch gegossene Substratgel gelegt und die Farbreaktion durch Abnehmen der Folien von dem Substratgel nach ca. 15 Min. gestoppt.

Blot-Puffer:

Tris	9,08 g	mit deion. Wasser auf
Glycin	43,28 g	auf 3 l aufgefüllt.
Methanol	600 ml	

Substratgel:

0,5 ml 3-Amino-9-Äthyl-Carbazol in Diäthylformamid gelöst (8 mg/ml)
8,0 ml Acetatpuffer (50 mM, pH 4,5)
10 µl H_2O_2

Zu obigem Ansatz (auf 37°C vorgewärmt) wurden 1,5 ml heiße (60 - 70°C) 1%-ige Agarose pipettiert und die Mischung in den Deckel einer Mikrotiterplatte gegossen. Nach 10 Min. war das Gel gebrauchsfertig.

3. Ergebnisse

3.1. Methode zum Nachweis von Mureinhydrolasen im Serum

Verfahren zur Bestimmung der Lysozymaktivität wurden schon früher beschrieben (57,58). Es wurden bakteriolytische Aktivität, Änderung der Trübung einer Suspension von Indikatorbakterien im Photometer oder die Fläche der Lysezone bestimmt, die eine Lysozymprobe auf Agar mit eingegossenen Indikatorbakterien (Micrococcus lysodeikticus) verursacht. Diese Methoden sind entweder sehr zeitraubend oder haben eine nicht ausreichende Empfindlichkeit. So benötigt der Diffusionstest auf Agarplatten über einen Tag und erfaßt nur Lysozymmengen von mehr als 1 µg/ml.

Der hier entwickelte Nachweis für Lysozym beruht auf der Solubilisation von ^{3}H-Dap-markiertem Murein von E. coli auf Grund der Spaltung der ß 1-4-Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetyl-glucosamin durch Lysozym. Nicht hydrolysiertes Murein wird durch Zentrifugation abgetrennt (vgl. 2.2.2.).

Da das Substrat nicht homogen ist und sich während des Abbaus verändert, besteht keine lineare Abhängigkeit zwischen freigesetzter Radioaktivität und der eingesetzten Enzymmenge. Jedoch lassen sich mit dieser Methode unbekannte Proben in bezug auf Hydrolaseaktivität miteinander vergleichen, und es sind sehr geringe Lysozymmengen nachweisbar. Abbildung 2 zeigt eine Titrationskurve mit Hühnereiweißlysozym. Die Nachweisgrenze liegt hierbei bei 2 ng. Mit dieser Methode ist es möglich, Hydrolaseaktivität im Humanserum bis zu einer Verdünnung um den Faktor 1 000 nachzuweisen (Abb. 3).

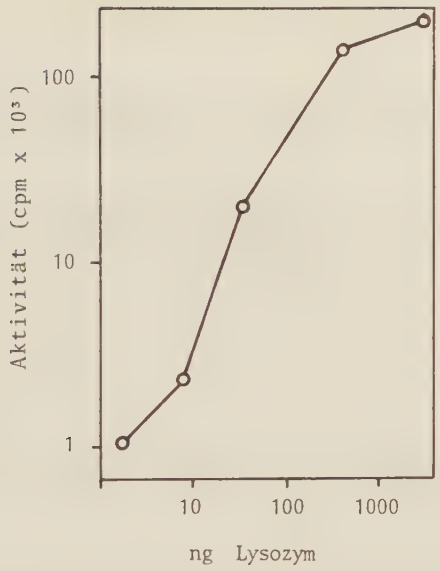


Abb. 2: Titrationskurve von Hühnereiweißlysozym über die Messung der Mureinhydrolaseaktivität (2.2.2.).

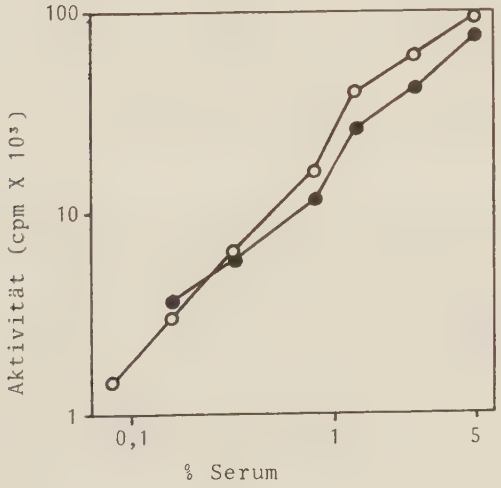


Abb. 3: Bestimmung von Mureinhydrolaseaktivität (2.2.2.) in Verdünnungen von Humanserum vor (—o—) und nach (—●—) Inaktivierung des Komplements (30 Min. 56°C).

3.2 Inaktivierung von Lysozym im Humanserum

3.2.1. Inaktivierung von Lysozym durch die Anti-Humanlysozym IgG-Fraktion aus Ziege

Studien über die bakterizide Wirkung von Serum erfordern die Abtrennung einzelner Lysefaktoren, um ihren Anteil bei der Abtötung pathogener Bakterien zu bestimmen.

Zu diesem Zweck wurde Humanserum mit verschiedenen Konzentrationen an Anti-Humanlysozym IgG behandelt (2.2.3.) um die benötigte IgG-Konzentration zur Inaktivierung des Serumlysozyms zu messen.

Tabelle 1 zeigt, daß sich mit den verwendeten Antikörpern keine vollständige Hemmung der Mureinhydrolaseaktivität des Serums erzielen läßt. Bei einer Konzentration von 200 µg IgG je ml Serum ist das Maximum der Inhibierung erreicht. Die Restaktivität, die 20 - 30% der Freisetzung von Radioakivität ohne Antikörperinaktivierung entspricht, kann durch Zugabe größerer Mengen IgG nicht weiter verringert werden. Für die Wirkung der Antikörper spielt es keine Rolle, ob dieselben nach Inkubation mit dem Serum durch Zentrifugation entfernt werden oder beim Mureinhydrolasetest im Serum bleiben.

Tabelle 1: Mureinhydrolaseaktivität nach Inaktivierung des Serums mit Anti-Humanlysozym IgG.
Das Serum wurde fünfzigfach verdünnt und mit Antikörper gegen Humanlysozym inkubiert. Die Hälfte der Ansätze wurde zentrifugiert und der Überstand im Mureinhydrolasetest (2.2.2.) eingesetzt (b). Mit dem anderen Teil der Proben wurde direkt nach Antikörperinaktivierung auf Mureinhydrolaseaktivität getestet (a).

Tabelle 1:

µg IgG/ml Serum	0	10	20	200	2 000	10 000
a) Aktivität (cpm)	73 328	68 528	64 404	21 091	23 224	19 934
b) Aktivität (cpm)	63 178	59 305	57 601	19 957	18 874	17 604

3.2.2. Inaktivierung von Lysozym durch zweite Antikörper

Als Erklärung der Resthydrolaseaktivität in 3.2.1. im Serum nach den Inaktivierungsversuchen mit Antikörper gegen Humanlysozym boten sich zwei Möglichkeiten an:

a) Es bilden sich Lysozym-Antikörper-Komplexe, die die Lysozymaktivität nicht vollständig hemmen und trotz Zentrifugation nicht präzipitierbar sind.

b) Eine andere enzymatische Aktivität ist für die Mureinhydrolyse verantwortlich, welche natürlich durch gegen Lysozym gerichtete Antikörper nicht inaktiviert werden kann.

Um den Fall a) zu prüfen wurden die Antikörper-Lysozym-Komplexe mit verschiedenen Konzentrationen von Antikörpern gegen Ziegen-Ig G präzipitiert. Es wurden ähnliche Mengen von löslichem Murein im Hydrolasetest gefunden wie in 3.2.1. (Tabelle 2).

Tabelle 2: Mureinhydrolaseaktivität von Serum nach Inaktivierung mit Anti-Lysozym Ig G und zweitem Antikörper. Die Anti-Lysozym Ig G Konzentration betrug mit Ausnahme des Null-Werts (kein Anti-Lysozym Ig G) 1,5 mg Ig G/ml Serum.

mg Antikörper gegen Ziegen Ig G/ml Serum	0	0,8	1,5	3,0
Aktivität (cpm)	61 195	15 175	13 434	13 631

3.3. Auftrennung von Humanserum über eine Gelfiltration mit Sephadex G 50

Da sich die Mureinhydrolaseaktivität im Serum durch Antikörperpräzipitation nicht vollständig eliminieren ließ, schien ein zweites hydrolytisches Enzym als wahrscheinlich.

Lysozym ist mit einem Molekulargewicht von ca. 13000 ein sehr kleines Protein. Die Abtrennung des Lysozyms von einer anderen vermuteten Mureinhydrolase versprach daher durch Gelfiltration Aussicht auf Erfolg.

Die Abbildung 4 zeigt den Verlauf der Mureinhydrolaseaktivität nach Auftrennung von Serum über Sephadex G 50. Von 170 bis 210 ml Elutionsvolumen kam das Lysozym von der Säule. Durch Behandlung dieser Fraktion mit gegen Lysozym gerichtetem Antikörper konnte diese Aktivität vollständig gehemmt werden. Bei einem zweiten Aktivitätsgipfel (im Ausschlußvolumen) konnten durch Immunpräzipitation mit Anti-Lysozym IgG die betreffenden Fraktionen in ihrer Aktivität nicht beeinflußt werden.

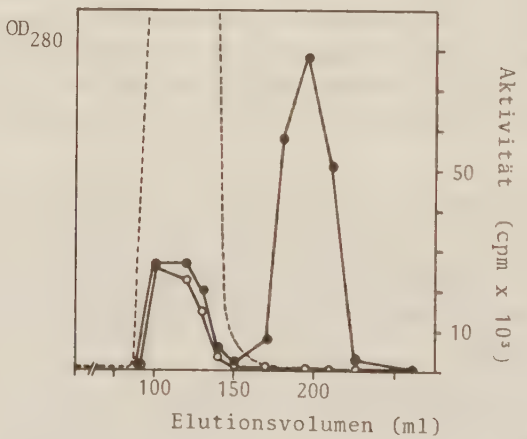


Abb. 4: Auftrennung von Humanserum über Sephadex G 50 und Bestimmung des Verlaufs der Mureinhydrolaseaktivität (nach 2.2.2.) einzelner Fraktionen mit (—o—) und ohne (—●—) Inaktivierung von Lysozym durch Antikörper. --- OD_{280}

3.4. Spaltungs- und Substratspezifität der neuen Serumhydrolase

3.4.1. Papierchromatographische Auftrennung der Mureinspaltstücke mit dem Laufmittelsystem Isobuttersäure-Ammoniumhydroxid

^{3}H-Dap-markierte Mureinsacculi von E. coli wurden mit der unbekannten Serumhydrolase (angereichert aus dem Serum über Gelfiltration und Ionenaustauschchomatographie) bis zum vollständigen Abbau des Mureins inkubiert und die Reaktionsprodukte durch das von STROMINGER beschriebene Papierchromatographie-System mit Isobuttersäure und 1 M Ammoniumhydroxid (5:3) aufgetrennt (Abb. 5).

Der Vergleich mit Hühnereiweißlysozym abgebauten Mureinsacculi zeigte zwar auch drei Spaltstücke, jedoch war bei dem ersten und zweiten Gipfel - bei Lysozymabbau entspricht Gipfel I dem Muropeptid-Dimeren, Gipfel II dem monomeren Muropeptid* - bei Verdau des Mureins mit der Serumhydrolase ein verändertes Laufverhalten im Chromatogramm zu beobachten. Die Laufstrecke der Mureinabbauprodukte war größer als bei Lysozymspaltung. Der Gipfel III (entspricht bei Lysozymspaltung kovalent an Lipoprotein gebundenem Muropeptid) zeigte für beide Enzyme identische Laufstrecken.

Eine präparative Auftrennung und Analyse der Mureinspaltstücke scheiterte an der Kontamination des Chromatographiepapiers mit Aminosäuren.

* monomeres Muropeptid: N-Acetyl-glucosaminyl-N-Acetyl-muramyl-Tri-(Tetra-)peptid

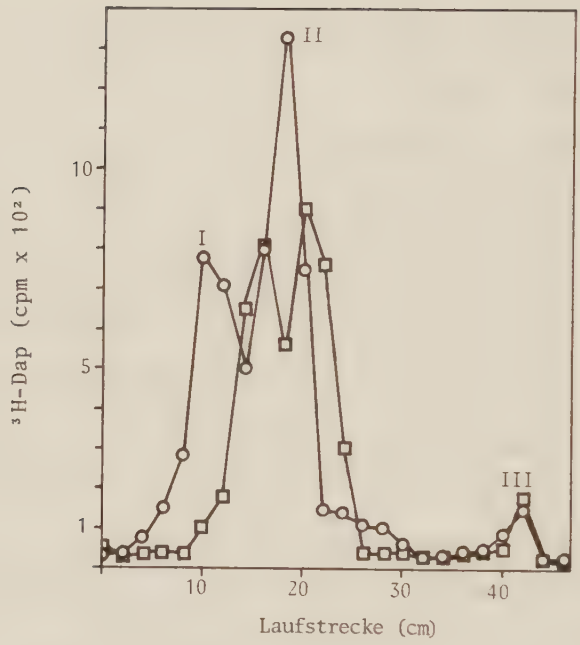


Abb. 5: *Chromatogramm der Lysozym- (—o—) und Serumhydrolaseabbauprodukte (—□—) des Mureinlipoprotein-Komplexes von E. coli W7. Das Murein war mit ^{3}H-Dap markiert. Es wurde auf Whatman 3 MM-Papier chromatographiert.*
Laufmittelsystem: Isobuttersäure - 1M Ammoniumhydroxid (5:3); Laufzeit 18 Std.
Lysozymspaltprodukte: I, dimeres Muropeptid;
II, momomeres Muropeptid;
III, Lipoprotein mit kovalent gebundenem Muropeptid.

3.4.2. Spaltung von Muropeptiden

Die Lysozym-Mureinabbauprodukte N-Acetyl-glucosaminyl(ß1-4)-N-Acetyl-muramyl-Tetra-(Tri-)peptid (C5/C6) und die daraus durch Transglykosylase entstandenen Anhydroformen (X/X') wurden mit der Serummureinhydrolase umgesetzt, welche durch Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie gereinigt wurde.

Da ^{3}H-Dap-markiertes C5/C6 und X/X' im Butanol-Wasser-Eisessig-Papierchromatographie-System verschiedenes Laufverhalten zeigten, die ^{3}H-Dap-haltigen Reaktionsprodukte hingegen gleich weit liefen, wurde eine Spaltung an der Peptidseitenkette vermutet (Abb. 6, Abb. 7). Die präparative Auftrennung der Reaktionsprodukte nach Mureinspaltung sollte weiteren Aufschluß über die Spezifität des Enzyms geben.

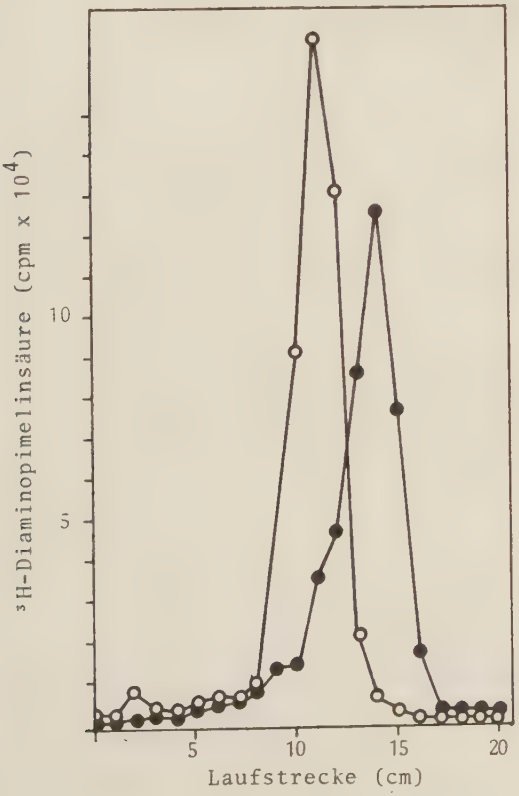


Abb. 6:

Chromatogramm von C5/C6 vor (—●—) und nach Inkubation (—○—) mit der Mureinhydrolase aus dem Serum. (Bedingungen wie in Abb. 7.)

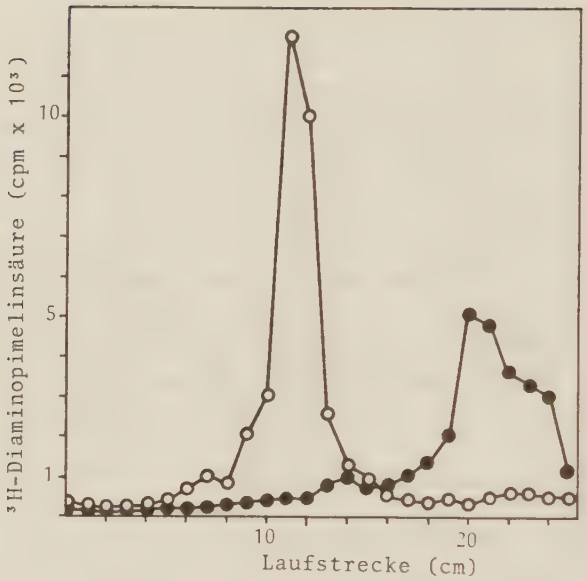


Abb. 7: *Chromatogramm von ^{3}H-Dap-markiertem N-Acetyl-glucosaminyl(ß1-4) 1,6-Anhydro-N-acetyl-muramyl-Tetra-(Tri-)peptid (X/X') vor (—●—) und nach (—○—) Inkubation mit der Mureinhydrolase aus dem Serum.*

Die Chromatographie wurde auf SS 2040b Papier (Schleicher & Schüll) mit der Oberphase aus n-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5) als Laufmittel durchgeführt. Die Laufdauer betrug 18 Std..

3.4.3. Präparative Auftrennung der Enzymspaltprodukte von Mureinsacculi

Um die Spaltungsspezifität der Serumhydrolase eindeutig zu bestimmen wurde das Murein nach dem enzymatischen Verdau papierchromatographisch aufgetrennt, die Laufstrecken der einzelnen Komponenten bestimmt (vgl. 2.2.12.), diese extrahiert und identifiziert (vgl. 2.2.7.).

Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung der isolierten Abbauprodukte vom Murein-Lipoprotein-Komplex. Unter den in Tab. 3 angegebenen Versuchsbedingungen spalteten die Abbauprodukte in 4 Flecken auf. Alle Muraminsäure und alles Glucosamin blieben auf dem Auftragspunkt des Chromatogramms liegen - ein Hinweis, daß die Zuckerketten nicht gespalten wurden. Die Aminosäuren Alanin, Glutaminsäure und Diaminopimelinsäure als Bestandteil des Muropeptids wurden aus drei Flecken isoliert, was die Abspaltung des ganzen Peptids von der Zuckerkette beweist.

Die am Start des Chromatogramms gefundenen Aminosäuren rührten entweder von der Enzymlösung oder vom Lipoprotein her. Sie ließen sich aber nur in sehr kleinen Mengen aus dem Papier extrahieren.

Wurde Murein mit Proteinase K vorinkubiert, so hydrolysierte dieses Proteasengemisch bis auf die beiden carboxyl-terminalen Aminosäuren Lysin und Arginin alles mureingebundene Lipoprotein von den Mureinsacculi. Dieses Substrat wurde ebenfalls der Spaltung mit der Serumhydrolase (gereinigt an Ionenaustauscher und über Gelfiltration) unterzogen. Durch eine längere Laufzeit bei der Papierchromatographie konnte eine bessere Auftrennung der Spaltprodukte erreicht werden (Tab. 4a).

Wiederum blieben Muraminsäure und Glucosamin am Start liegen und dort wurden keine anderen Aminosäuren gefunden. Dieser Punkt und die Aminosäurezusammensetzung in den extrahierten Flecken ließen nur den Schluß zu, daß es sich bei der Serumhydrolase um eine N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase handelt, die die Amidbindung zwischen N-Acetyl-muraminsäure und L-Alanin im Murein spaltet.

Die in Tab. 4 zusätzlich auftauchenden Flecken mit geringer Beweglichkeit während der Chromatographie sind Murein-Peptide mit den basischen Aminosäureresten Arginin und Lysin des ursprünglich daran gebundenen Lipoproteins.

Zum Vergleich wurde Proteinase K behandeltes Murein mit Lysozym gespalten. Alle Flecken, in die die Reaktionsprodukte aufspalteten, enthielten neben den Mureinaminosäuren gleichzeitig Glucosamin und Muraminsäure, wie es nach der Spaltung von Kohlenhydratketten zu erwarten ist (Tab. 4b).

Tab. 3: Zusammensetzung der Reaktionsprodukte nach Spaltung des Murein-Lipoprotein-Komplexes von E. coli durch die Serumhydrolase.

Die durch das Enzym freigesetzten Mureinfragmente wurden über absteigende Papierchromatographie (System: Oberphase von n-Butanol-Eisessig-Wasser; 4:1:5) bei einer Laufzeit von 18 Std. aufgetrennt, aus dem Papier extrahiert und nach Hydrolyse in 6 N HCl über Aminosäureanalyse auf ihre Zusammensetzung untersucht.

Laufstrecke (cm)	Glu (nMol)	Ala (nMol)	Dap (nMol)	Glucosamin (nMol)	Muraminsäure (nMol)
0	9,10	12,76	5,40	20,10	21,23
2,5- 5,0	32,01	49,59	26,16	0	0
9,0- 10,5	18,17	18,03	14,52	0	0
10,5- 13,0	23,80	32,36	16,01	1,35	0

Tab. 4: Zusammensetzung der Reaktionsprodukte nach Spaltung von lipoproteinfreiem Murein durch die Serumhydrolase (Tab. 4a) und Lysozym aus Hühnereiweiß (Tab. 4b). Methodisch wurde wie in Tab. 3 beschrieben vorgegangen. Die einzige Änderung bestand in einer Verlängerung der Chromatographierzeit auf 31 Std..

Tab. 4a:

Laufstrecke (cm)	Glu (nMol)	Ala (nMol)	Dap (nMol)	Glucosamin (nMol)	Muraminsäure (nMol)	Lys (nMol)	Arg (nMol)
0	0,99	1,78	1,21	60,58	68,07	0,5	0,5
0,5 - 2,5	7,22	8,77	7,51	0,3	0,3	3,32	2,61
2,5 - 5,0	9,08	12,51	9,41	0	0	3,55	2,65
6,0 - 11,0	34,09	46,70	33,00	0	0	0	0
19,0 - 23,0	11,82	11,37	11,79	0	0	0	0
24,5 - 28,5	22,15	34,52	22,18	0	0	0	0

Tab. 4b:

Laufstecke (cm)	Glu (nMol)	Ala (nMol)	Dap (nMol)	Glucosamin (nMol)	Muraminsäure (nMol)	Lys (nMol)	Arg (nMol)
0	18,20	25,60	23,50	14,77	11,40	6,25	4,37
4,0- 7,0	12,23	13,54	11,77	12,16	12,97	7,56	6,64
10,0-13,0	15,09	20,80	13,81	15,00	15,99	0	0
15,0-18,0	3,14	4,45	2,95	+	+	0	0
23,5-27,5	5,70	9,00	4,99	+	+	0	0
29,5-34,5	32,14	45,75	30,04	27,33	28,80	0	0

+ Substanz nachgewiesen, aber nicht quantitativ bestimmt.

3.4.4. Nachweis der Abspaltung des Lipoproteins von den Zuckerketten

Nach Amidase-Verdau von ^{3}H-Dap-markierten Mureinsacculi wurde bei der Papierchromatographie in 3.4.1. (System: Isobuttersäure/Ammoniumhydroxid) ein Reaktionsprodukt gefunden, das gleiches Laufverhalten zeigte wie Lipoprotein mit kovalent gebundenem Muramylpeptid.

Dieser Befund und das Ergebnis von 3.4.3., wo das Enzym als eine N-Acetyl-muramyl-L-Alanin-Amidase charakterisiert wurde sprachen dafür, daß diese Komponente Lipoprotein mit dem Desmuramylpeptid war. Auf Grund des Chromatographierverhaltens mußte eine Abspaltung des Lipoproteins von den Zukkerketten angenommen werden.

Den endgültigen Beweis der Abspaltung des Lipoproteins von der Polysaccharidkette durch die Amidase sollte die Isolierung eines der Reaktionsprodukte erbringen.

Bei der Auftrennung der Abbauprodukte vom Murein-Lipoprotein-Komplex durch die Serumamidase mittels HPLC-Gelfiltration (vgl. 2.2.14.) eluierte das Lipoprotein im Ausschlußvolumen. Da die Zuckerketten auch aggregierten und in der gleichen Fraktion wie das Lipoprotein von der Säule kamen, konnte auf dieses Weise die Abspaltung des Lipoproteins von den Zuckerketten nicht gezeigt werden. Allerdings wurde durch Variation der Ionenstärke bei der Gelfiltration beim Vergleich verschiedener Fraktionen Schwankungen im Verhältnis der Lipoproteinreste zu den Muraminsäure- bzw. Glucosaminresten von 1:15 bis 1:5 gefunden. Dieser Befund läßt sich nur durch vorherige Freisetzung des Lipoprotein von den Zuckerketten erklären.

3.4.4.1. HPLC-Gelfiltration nach Fällung mit N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)

Da polymeres Kohlenhydrat sich durch 0,5% CTAB in Kälte fällen läßt (59), wurde der Inkubationsansatz aus Murein und Amidase nach Reaktionsablauf mit CTAB gefällt und über HPLC-Gelfiltration aufgetrennt.

Im Ausschlußvolumen wurde Lipoprotein gefunden, welches mit Protein aus der Amidasefraktion kontaminiert war. Es konnte keine Muraminsäure nachgewiesen werden, wie es bei Bindung des Lipoproteins an die Mureinzuckerketten zu erwarten gewesen wäre. Eine Bestimmung des Glucosamins konnte nicht durchgeführt werden, weil die Proteinkontamination Phenylalanin enthielt, und diese Aminosäure zeigte bei der Analyse durch den Aminosäureanalysator den gleichen Retentionswert wie das Glucosamin.

3.4.4.2. HPLC-Gelfiltration nach Spaltung mit Lysozym

Die Amidase wurde nach Inkubation mit dem Lipoprotein-Murein-Komplex durch Hitze inaktiviert (5 Min., 100°C). Der Ansatz wurde danach zum Abbau der Zuckerketten mit Lysozym versetzt.

Bei der Analyse des eluierten Lipoproteins im Ausschlußvolumen nach HPLC-Gelfiltration wurde keine Muraminsäure gefunden. Bei kovalenter Bindung von Lipoprotein an die Zuckerketten würde man nach Lysozymabbau pro Molekül Lipoprotein drei Muraminsäurereste erwarten (60).

Glucosamin konnte aus den in 3.4.4.1. erwähnten Gründen nicht bestimmt werden.

3.4.4.3. HPLC-Gelfiltration nach Spaltung mit Proteinase K

Nach Einwirkung von Proteinase K auf den Murein-Lipoprotein-Komplex wurde ein Murein vorgefunden, das neben den typischen Bestandteilen wie Glucosamin, Muraminsäure, Alanin, Glutaminsäure und Diaminopimelinsäure die beiden Aminosäuren Arginin und Lysin in zehnmal geringerem Umfang enthielt. Dabei handelte es sich um die beiden endständigen Aminosäuren des Lipoproteins (vgl. 3.4.3.), welche die Proteinase K nicht abspalten kann.

Die Amidase wurde nach Inkubation mit dem Murein-Lipoprotein-Komplex hitzeinaktiviert, dann der ganze Ansatz mit Proteinase K behandelt. Die nach der HPLC-Gelfiltration im Ausschlußvolumen fraktionierten Zuckerketten waren absolut frei von Aminosäuren - ein weiteres Ergebnis, das die vollständige Abspaltung des Lipoproteins vom Mureinsacculus durch die Amidase v o r der Proteinaseeinwirkung beweist.

3.4.5. Murein von Micrococcus lysodeikticus als Substrat

Bisher konnte gezeigt werden, daß ganze Mureinsacculi von E. coli bzw. Muropeptide ein geeignetes Substrat für die Amidase darstellen.

Mit Murein aus Micrococcus lysodeikticus sollten zwei Fragen geklärt werden:
a) Ist das vielschichtige Murein gram-positiver Bakterien für die Amidase zugänglich?
b) Ermöglicht die veränderte Peptidseitenkette (Abb. 8) von M. lysodeikticus noch die Spaltung durch das Enzym?

Die Isolierung des Mureins ist in 2.2.1.4. beschrieben. 400 ml Zellsuspension mit einer OD_{578} von 0,7 führten zu einer Ausbeute von 10 µMol Peptiduntereinheit. Eine Aminosäureanalyse bestätigte, daß das Murein hinreichend rein war. Nicht zum Murein gehörende Aminosäuren wurden in der Größenordnung von 10% des Glutaminsäurewertes gefunden. Die Aminosäurezusammensetzung der Peptidkette (Tab. 5a) stimmte mit dem theoretischen Wert gut überein.

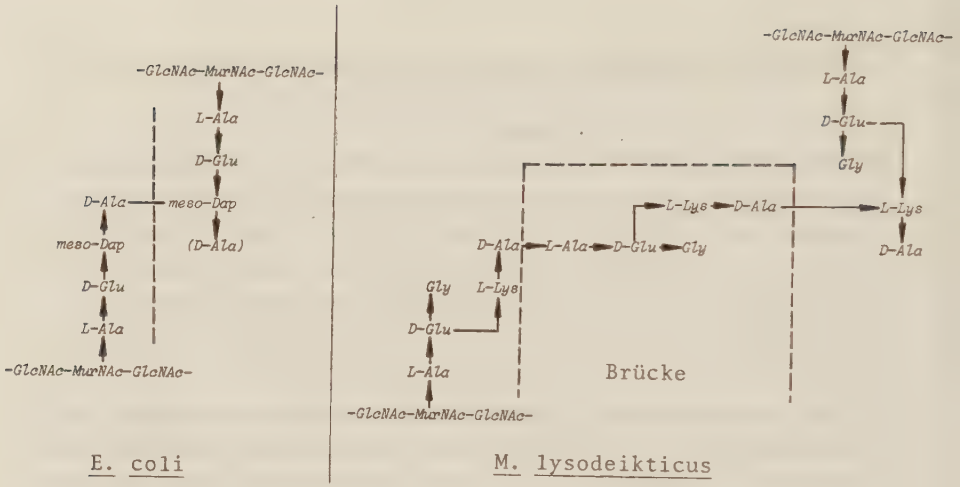


Abb. 8: Mureinstruktur von Escherichia coli und Micrococcus lysodeikticus (79).

Tab. 5: Zusammensetzung von Murein aus Micrococcus lysodeikticus (Tab. 5a) und der Spaltprodukte nach Verdau mit der N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase.

Tab. 5a:

	Alanin	Glutaminsäure	Lysin	Glycin	Glucosamin
Reste je Mureinuntereinheit	2,00*	1,29	1,01	1,14	0,95
Literaturwerte der Peptidzusammensetzung (61)	1,9- 2,1	1,0- 1,3	1	0,9- 1,1	

*Die Berechnung der Anzahl der Aminosäurereste je Mureinuntereinheit erfolgte auf der Basis von zwei Alaninresten je Monomer. Muraminsäure wurde nicht quantitativ bestimmt.

Tab. 5b: Mureinsacculi, die einer Menge von 200 nMol Mureinuntereinheiten entsprachen, wurden mit dem Enzym verdaut und anschließend die löslichen Produkte, die nicht in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugierbar waren papierchromatographisch (vgl. 2.2.12.) getrennt, extrahiert, hydrolysiert und über Aminosäureanalyse quantitativ bestimmt.

Laufstrecke (cm)	Alanin	Glutaminsäure	Lysin	Glycin	Glucosamin
0	13,9 nMol	9,6 nMol	5,6 nMol	8,9 nMol	17,7 nMol
0 (Zahl der Reste)	2*	1,38	0,81	1,28	2,5
8 - 15	39,2 nMol	22,1 nMol	20,4 nMol	18,9 nMol	0
8 - 15 (Zahl der Reste)	2*	1,12	1,04	0,96	0

*Für die Berechnung der Anzahl der Aminosäurereste wurde von zwei Alaninresten ausgegangen.

Von dem mit der Amidase inkubierten Murein von Micrococcus lysodeikticus konnten ungefähr 15% als lösliche Komponenten nach Zentrifugation und papierchromatischer Auftrennung wiedergefunden werden.

Am Start des Chromatographiesystems blieben die Zuckerketten liegen. Bei den ebenfalls am Start gefundenen Aminosäuren handelt es sich entweder um noch an der Muraminsäure gebundenes Peptid oder um oligomere Formen des Pentapeptids von M. lysodeikticus, welche sich in diesem System nicht bewegen (Tab. 5b).

Entscheidend ist, daß es gelang durch Analyse des Chromatographieflecks im Bereich 8-15 cm zu zeigen, daß die hier isolierte Komponente ein Peptid ist mit der Zusammensetzung Alanin-Glutaminsäure-Lysin-Glycin im Verhältnis 2:1:1:1 (Tab. 5b). In diesem Fleck konnte weder Muraminsäure noch Glucosamin nachgewiesen werden.

Als mögliche Ursachen für die nur teilweise Hydrolyse des Mureins - von 200 nMol Murein (bezogen auf die Untereinheit) wurde nur etwa 20 nMol von den Mureinsacculi abgespaltenes Peptid wiedergefunden - bieten sich folgende Erklärungen an:

1) Nur teilweise Hydrolyse der Muramyl-Alanin Amidbindungen, weil zu wenig Enzym eingesetzt wurde.
2) Die Amidase kann das Peptid nicht komplett aus den Mureinsacculi spalten.
3) Durch die Verknüpfung der Peptidseitenketten untereinander bilden sich Oligomere, die trotz Abspaltung von der Zuckerkette unlöslich bleiben und dadurch nicht erfaßt werden können.

Auch sind Ausbeuteverluste bei der Isolierung des durch das Enzym gespaltenen Mureins zu berücksichtigen. Diese belaufen sich auf mindestens 30% des eingesetzten Mureins.

3.5. Charakterisierung der Amidase

3.5.1. Das pH-Optimum

3.5.1.1. Muropeptid als Substrat

Die Aktivität der Amidase ist von den jeweiligen Pufferionen abhängig. So war die Enzymaktivität in Tris/HCl-Puffer deutlich höher als in Phosphatpuffer bei gleichen sonstigen Inkubationsbedingungen. Um dem Dilemma nicht vergleichbarer Messungen durch Pufferwechsel zu entgehen, fand bei der Untersuchung der Amidaseaktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes ein Universalpuffer nach Britton-Robinson Verwendung (2.2.16.). Das Substrat, ^{3}H-Dap-markiertes N-Acetyl-glucosaminyl-(ß1-4) 1,6-Anhydro-N-acetyl-muramyl-Tri-(Tetra-)peptid (X/X'), wurde nach Inkubation mit dem Enzym papierchromatographisch aufgetrennt (2.2.12.9.). Über die Anteile von Substrat und abgespaltenem Peptid ließ sich die Enzymaktivität errechnen. Die Spaltung von X/X' war im Alkalischen maximal (Abb. 9 A). Bei höheren pH-Werten als pH 10 wurde nicht gemessen, weil da die Gefahr bestand, daß das Substrat ohne Enzymeinwirkung durch ß-Elimination in Peptid und Zucker zerfiel.

3.5.1.2. Mureinsacculi als Substrat

Bei der Spaltung von Mureinsacculi, bei welcher die Freisetzung von löslichem, ^{3}H-Dap-markiertem Material aus den Mureinhüllen ein Maß für die Enzymaktivität lieferte, war die Amidase ebenso wie bei der Umsetzung von Muropeptid über einen breiten pH-Bereich aktiv. Es traten zwei Aktivitätsmaxima auf, das Hauptmaximum lag jedoch im schwach Sauren bei pH 6,0 (Abb. 9 B).

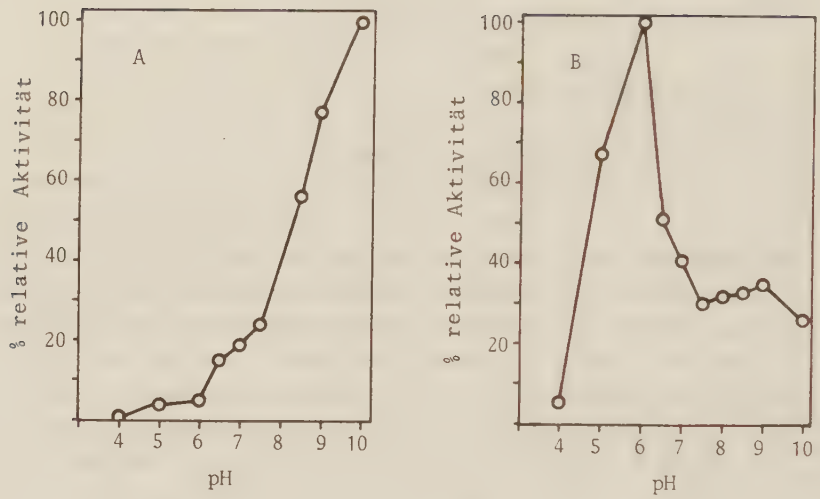


Abb. 9: *Abhängigkeit der Aktivität der N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase vom pH mit N-Acetyl-glucosaminyl-(β1-4) 1,6-Anhydro-N-acetyl-muramyl-Tri-(Tetra)peptid (A) und Mureinsacculi (B) von E. coli als Substrat. Bei A wurde nach der Enzymspaltung das ^{3}H-Dap-markierte Peptid über Papierchromatographie isoliert, bei B wurde die Radioaktivität des ^{3}H-Dap-haltigen Überstands nach Zentrifugation gemessen. Die Enzymaktivitätsmessung wurde in Universalpuffer nach Britton-Robinson vorgenommen. Der Meßwert mit der größten Aktivität wurde als 100% relative Aktivität gesetzt.*

3.5.2. Proteaseinhibitoren

Um die N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase vor Serumproteasen während der Isolierung zu schützen, wurde nach geeigneten Proteaseinhibitoren gesucht, d. h. nach Hemmstoffen, die die Amidase in ihrer Aktivität nicht beeinflussen. Es wurden eine Reihe von Proteaseinhibitoren getestet (Tab. 6). Phenylmethylsulfonylfluorid, ein weit verbreiteter Inhibitor für Serinproteasen (62), zeigte keine Hemmung der Amidase. Ebenso waren der Trypsininhibitor TLCK, der Chymotrypsininhibitor TPCK, p-Aminobenzamidin und N-Äthylmaleinimid wirkungslos. Hemmstoffe für Metalloenzyme wie Chlormercuribenzolsulfonsäure, Orthophenanthrolin und Komplexbildner für zweiwertige Ionen wie Äthylendiamintetraacetat und Äthylenglycol-bis(2-aminomethyl)-tetraacetat inhibierten die Amidase.

Tab. 6: Wirkung von Proteaseinhibitoren auf die N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase. Das Enzym wurde vorinkubiert mit den Hemmstoffen in 50 mM Tris/HCl Puffer (pH 7,5) mit 4 mM $MgCl_2$ und 0,02% NaN_3. Die Freisetzung von radioaktivem, löslichem Material aus ^{3}H-Dap-markierten Mureinsacculi gab Aufschluß über die Enzymaktivität nach Einwirkung des Hemmstoffes.

Substanz	Konzentration	Hemmung
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	0,2 mM	-
PMSF	2,0 mM	-
L-1-Chlor-3-p-tosylimido-7-amino-2-heptanon (TLCK)	1,0 mM	-
TLCK	5,0 mM	-
N-Tosyl-L-phenylchlormethan (TPCK)	1,0 mM	-
TPCK	5,0 mM	-

Tab. 6:
(Fortsetzung)

Substanz	Konzentration	Hemmung
N-Äthylmaleinimid (ÄMI)	1,0 mM	-
ÄMI	10,0 mM	-
p-Aminobenzamidin (ABA)	3,0 mM	-
ABA	15,0 mM	-
p-Chlormercuribenzol-sulfonsäure (CMPS)	1,0 mM	+
CMPS	5,0 mM	+
Orthophenanthrolin (OPA)	10,0 mM	+
OPA	50,0 mM	+
Äthylendiamintetraacetat (EDTA)	1,0 mM	-
EDTA	5,0 mM	-
EDTA	25,0 mM	+
Äthylenglycol-bis(2-amino-methyl)-tetraacetat (EGTA)	0,2 mM	+
EGTA	10,0 mM	+

- = keine Hemmung, + = Hemmung

3.5.3. Reduktionsmittel, Detergenzien

Reduzierende Substanzen wie Mercaptoäthanol und Dithiothreitol führten zu einer Verminderung der Amidaseaktivität. Schon 0,1% ige Lösungen dieser Reduktionsmittel inaktivierten das Enzym spürbar. 1% Dithiothreitol verursachte eine fast vollständige Inaktivierung der Amidase. Ebenso wurde das Enzym durch NaDS inaktiviert.

3.5.4. Bestimmung des Molekulargewichts

Das Molekulargewicht der Amidase wurde über Gelfiltration an Sephadex G 100 und Sephadex G 200 superfine bestimmt. Es wurden gleichzeitig Eichproteine und eine Probe vorgereinigter Amidase gelfiltriert. Die Eichung der Gelfiltrationssäulen mit den Standardproteinen erfolgte über Transmissionsmessung bei der Elution. Die Identifizierung der Amidase erfolgte über die Aktivitätsmessung des Enzyms.

Die Molekulargewichtsbestimmung mit Sephadex G 100 ergab eine Größe der Amidase von über 70 000. Da hier das Enzym nahe dem Ausschlußvolumen von der Säule eluierte, wurde mit Gelfiltration über Sephadex G 200 superfine eine verläßliche und genauere Molekulargewichtsbestimmung durchgeführt. Diese Messung ergab ein Molekulargewicht von 82 000 für das Enzym (Abb. 10).

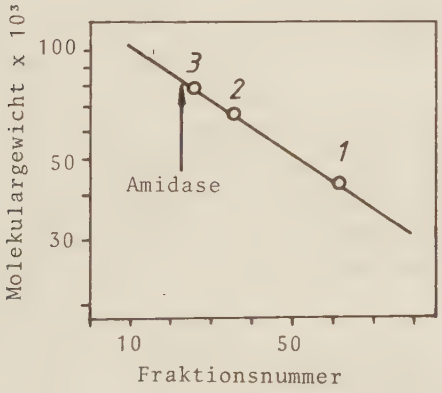


Abb. 10: Bestimmung des Molekulargewichts der Amidase über Gelfiltration mit Sephadex G 200 superfine. Eichproteine: 1 Ovalbumin, 2 Rinderserumalbumin, 3 Humantransferrin. Eichproteine und Enzym wurden durch Cochromatographie aufgetrennt. Die Amidase wurde durch die Freisetzung löslicher Radioaktivität der entsprechenden Fraktion identifiziert.

3.6. Reinigung des Enzyms

3.6.1. Fällung mit Ammoniumsulfat

Um die Möglichkeit einer groben Anreicherung des Enzyms durch Ammoniumsulfatfällung zu prüfen, wurde eine nach Ionenaustauschchromatographie und Dialyse lysozymfreie und entsalzte Serumprobe einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen und die enzymatische Aktivität der jeweiligen Fraktion gemessen. Der Hauptanteil der Amidase fiel bei einer Sättigung zwischen 50 und 60% Ammoniumsulfat aus. Da ab 30% einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung Amidase im Sediment auftauchte und zudem das Fällungsverhalten des Gesamtproteins im Serum dem der Amidase ähnlich war, wurde bei der weiteren Isolierung des Enzyms auf Ammoniumsulfatfällung verzichtet.

3.6.2. Ionenaustauschchromatographie

3.6.2.1. Serumvorbereitung für den Ionenaustauscher

Da Natrium- und Chloridionen im Serum in einer Konzentration von mehr als 100 mM vorkommen, wurde Serum wie in 2.2.13.2. beschrieben gegen 20 mM Tris-Puffer dialysiert.

3.6.2.2. Ionenaustauscher QAE-Sephadex A 50

Wurde dialysiertes Serum mit erniedrigter Ionenstärke auf die stark basische QAE-Anionenaustauschersäule gepumpt, so band die Amidase, wohingegen das basische Lysozym ohne Wechselwirkung mit dem Austauschermaterial durch die Säule lief. Nach Anlegen eines Kochsalzgradienten wurde das Enzym bei etwa 100 mM NaCl von der Säule eluiert (Abb.11a).

3.6.2.3. Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sephadex A 50

Bei der Reinigung der N-Acetyl-muramyl-Alanin Amidase über den schwach basischen Anionenaustauscher eluierten die enzymhaltigen Fraktionen bei einer Konzentration zwischen 55 und 70 mM NaCl (Abb. 11b) von der Säule. Verglichen mit der Reinigung der Amidase mit QAE -Sephadex-Ionenaustauscher hatte die Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex den Vorteil, daß hier die amidasehaltigen Fraktionen mit weniger Fremdprotein - speziell Serumalbumin - kontaminiert waren. Abb. 12 zeigt Polyacrylamidgele der Fraktionen mit dem Enzym. Keine Bande im Bereich von 80 000 Dalton konnte der Amidase zugeordnet werden.

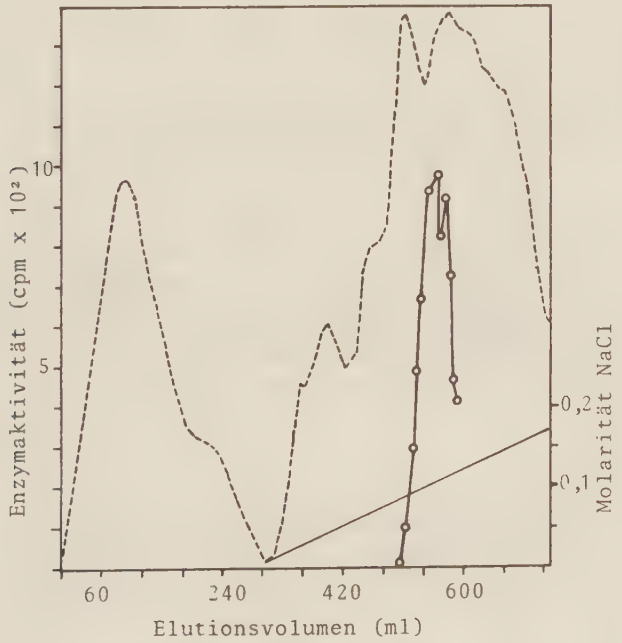


Abb. 11a: Elutionsdiagramm der Trennung von N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase an QAE-Sephadex A 50. Startpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,9. Die Enzymaktivität wurde über die Solubilisation von ^{3}H-Dap-markierten Mureinsacculi bestimmt. --- Extinktion bei 254 nm, —— Kochsalzgradient, —o— Enzymaktivität.

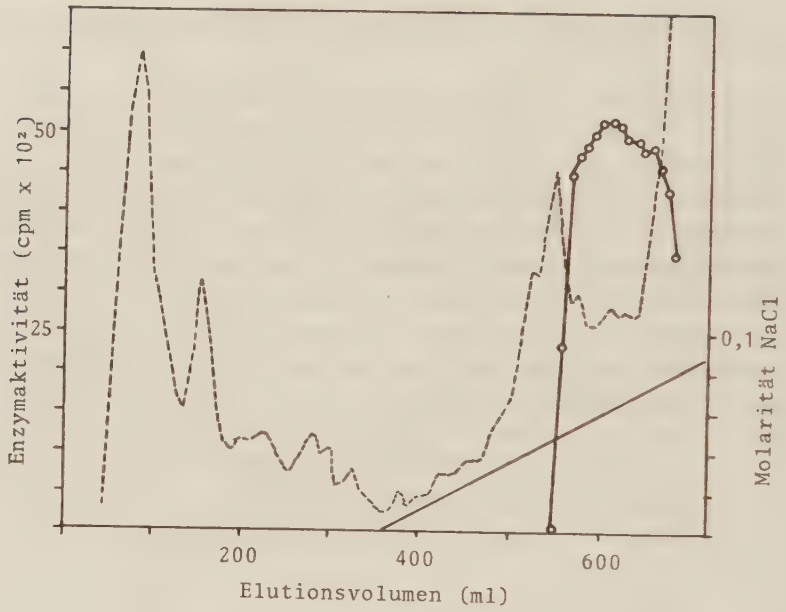
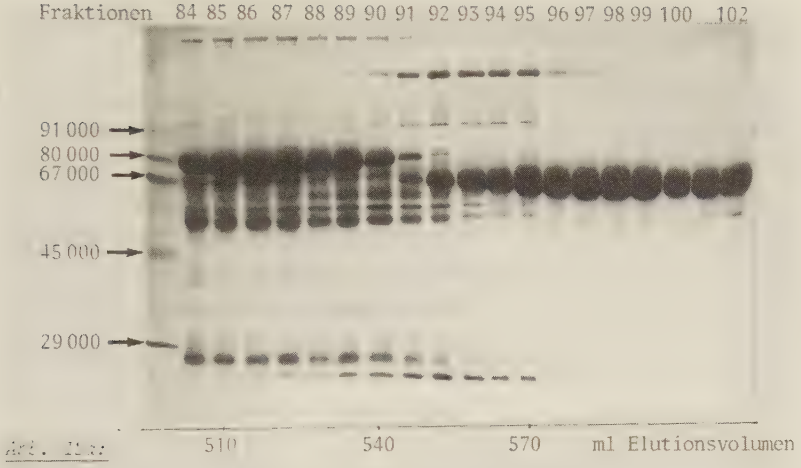


Abb. 11b: *Elutionsdiagramm der Trennung von N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase an DEAE-Sephadex A 50. Startpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,9. Die Enzymaktivität wurde über die Solubilisation von ^{3}H-Dap-markierten Mureinsacculi bestimmt. ---- Extinktion bei 254 nm, —— Kochsalzgradient, —o— Enzymaktivität.*



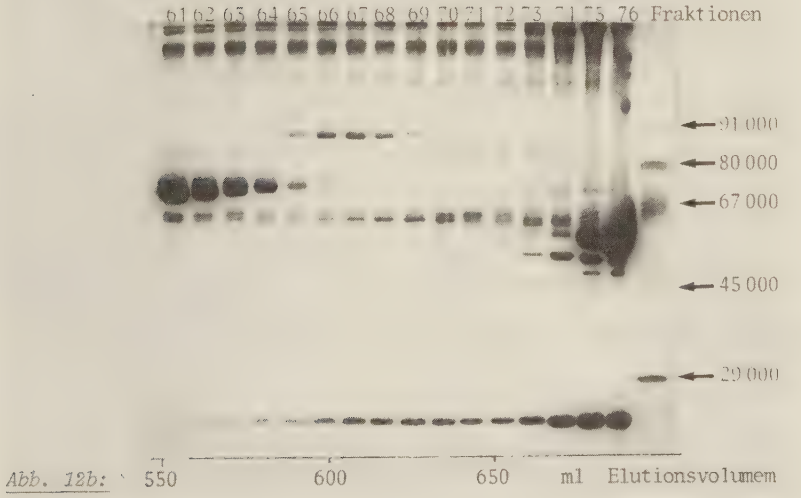


Abb. 12: *Proteinmuster der amidasehaltigen Fraktionen nach Auftrennung von Serum an QAE-Sephadex(a) bzw. an DEAE-Sephadex(b) im NaDS-Gelelektrophoresesystem nach Lugtenberg. Enzymaktivität vgl. Abb. 11.*

3.6.3. Gelfiltration

Die über Ionenaustauschchromatographie angereicherten Amidasefraktionen wurden mit verschiedenen Gelsorten filtriert. Von den getesteten Gelen Ultrogel AcA 34, Ultrogel AcA 44, Sephadex G 100 und Sephadex G 200 superfine erwies sich letzteres als am effektivsten. Bei der Gelfiltration mit Sephadex G 200 superfine kam praktisch die ganze Enzymaktivität in den Fraktionen 19, 20 und 21 von der Säule. Wie in Abb. 13 zu sehen ist, konnte diesen Fraktionen keine gemeinsame Proteinbande im Bereich um 80 000 Molekulargewicht zugeordnet werden.

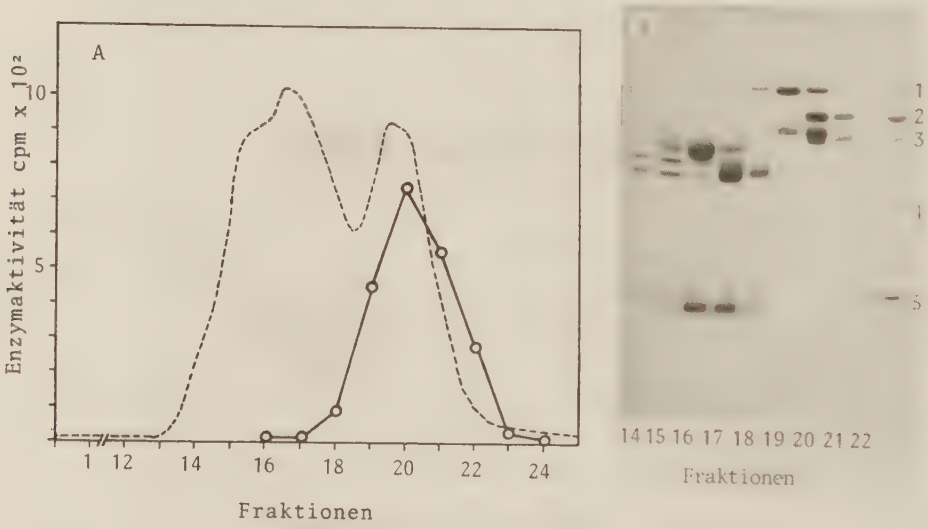


Abb. 13: Elutionsdiagramm der Trennung von Amidase über Gelfiltration an Sephadex G 200 superfine (A) und Proteinmuster der einzelnen Fraktionen nach NaDS-Gelelektrophorese (B).
--- Extinktion bei 254 nm, —o— Enzymaktivität.
Eichproteine: 1 Phosphorylase A (91 000), 2 Humantransferrin (80 000), 3 Rinderserumalbumin (67 000), 4 Ovalbumin (45 000), 5 Carboanhydrase (29 000).

3.6.4. Chromatographie durch hydrophobe Wechselwirkungen

Durch hydrophobe Wechselwirkung mit Phenyl-Sepharose sollte der durch die beiden Schritte Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration erhaltene Enzymextrakt einer weiteren Reinigung unterzogen werden.

Die Amidase band sehr gut an dieses Gelmaterial und konnte erst durch Anlegen eines Gradienten von 20 mM Phosphat gegen Wasser von der Säule eluiert werden. Die Aktivität der so erhaltenen Fraktionen korrelierte mit einer Proteinbande, die im NaDS-Gel eine Größe von etwa 75 000 Molekulargewicht hatte (Abb. 14).

Die Phenyl-Sepharose fand bei der weiteren Enzymreinigung keine Anwendung, da sich herausstellte, daß nach diesem Säulenlauf sich die spezifische Aktivität des Enzyms drastisch verringerte.

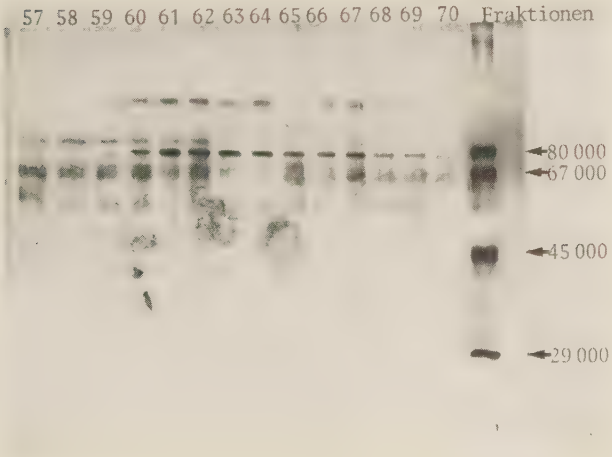


Abb. 14: Polyacrylamidgel von den Amidase-Fraktionen nach Auftrennung über Phenyl-Sepharose des über Gelfiltration und Ionenaustauscher vorgereinigten Enzyms. Die Fraktionen 62 und 63 zeigten die größte Enzymaktivität. Es folgten die Fraktionen (Reihenfolge nach Enzymaktivität) 61, 64, 65, 66, 67, 68, 60, 69, 70, 59.

3.6.5. FPLC-System

FPLC steht für schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie. Herkömmliche Ionenaustauschersäulen haben Laufzeiten von mehreren Tagen. Der Vorteil dieses FPLC-Systems liegt in extrem kurzen Trennungszeiten um 30 Min.. Dadurch ist es möglich durch Variation von Flußgeschwindigkeit, pH, Pufferzusammensetzung und Salzgradient den Säulenlauf auf ein spezielles Trennproblem abzustimmen. Da die Bindekapazität für Protein durch die Säulengröße (1 ml Bettvolumen) begrenzt ist, eignet sich diese Methode zur Weiterreinigung des bereits vorgereinigten Enzyms.

3.6.5.1. Chromatographie an Mono Q

Mono Q ist ein Anionenaustauscher mit anderen funktionellen Gruppen als die Sephadex-Anionenaustauscher. Dieser Umstand und die Optimierung der Parameter pH, Puffersubstanz, Flußrate, Art und Steilheit des Gradienten führten zu einer weiteren Anreicherung der über DEAE-Sephadex und Gelfiltration vorgereinigten Amidase. Abb. 15 zeigt das Elutionsprofil und die Aktivitätsverteilung des Enzyms nach einem Mono Q FPLC-Lauf. In den drei Fraktionen mit den Retentionszeiten 23,51 , 26,14 und 27,20 Min. wurde das Enzym nachgewiesen. Bei der elektrophoretischen Analyse der einzelnen Fraktionen wurde eine hauchdünne Bande in Bereich 70 000 bis 75 000 gefunden, die allein den amidasehaltigen Fraktionen gemeinsam war (Abb. 16).

Abb. 15: Trennung der N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase an Mono Q. Gradientenverlauf und Puffer vgl. 2.2.13.4.. Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde über die Freisetzung von löslichem, radioaktivem Material durch die Amidase aus ³H-Dap-markiertem Murein vorgenommen.
—— Extinktion bei 230 nm, —o— Enzymaktivität.

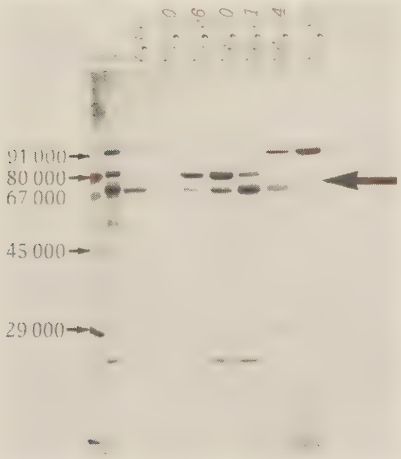


Abb. 16: Polyacrylamidgel der Fraktionen nach Trennung der Amidase an Mono Q. Das den enzymhaltigen Fraktionen, welche nach 23,51, 26,14 und 27,20 Min. eluierten, gemeinsame Protein ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. A Standardproteine, B vorgereinigtes Enzym vor der Trennung, die Zahlen über der Gelspuren geben die mittlere Retentionszeit der jeweiligen Fraktion an.

3.6.5.2. Abspaltung von Sialinsäure

Vorgereinigte Enzymfraktionen, die über Polyacrylamidgel-elektrophorese aufgetrennt wurden, reagierten auf Anfärbung von Zucker positiv, d. h. weit über die Hälfte der in diesen Fraktionen enthaltenen Proteine erwiesen sich als Glykoproteine (nicht gezeigt).
Unter der Annahme, daß unter diesen vielen Proteinen, die ja alle eine negative Gesamtladung hatten (Bindung an den Anionenaustauscher) auch Glykoproteine mit Sialinsäureresten sich befanden, wurde über zwei Säulen gereinigte Amidase einer Inkubation mit Neuraminidase unterzogen.
Das Proteinbandenmuster im Polyacrylamidgel der angereicherten Amidase mit und ohne Neuraminidasespaltung war in diesem nach Proteingröße auftrennenden System unterschiedlich (Abb. 17).

Abb. 17: NaDS-Gel nach der Enzymreinigung über zwei Säulen (Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration) vor (A) *und nach* (B) *Neuraminidaseinkubation.*

Viel drastischer sollten jedoch die Auswirkungen von abgespaltenen Sialinsäureresten im Elutionsverhalten von Glykoproteinen sein, die über Ionenaustauscher getrennt werden. Wie in Abb. 18 zu sehen ist, banden nach der Neuraminidasebehandlung von der über DEAE-Sephadex und Sephadex G 200 sf angereichten Enzympräparation nur noch 50% der Proteine an den Mono Q Anionenaustauscher.

Dieses Experiment gab zwei Hinweise hinsichtlich der Charakterisierung der Amidase.

Da sich die Retentionszeit für die Elution des Enzyms änderte, muß man annehmen, daß die Amidase ein Glykoprotein ist und durch Abspaltung der Sialinsäurereste die Wechselwirkung zum Ionenaustauscher abgeschwächt wurde und dadurch die Amidase früher von der Säule kam.

Die in 3.6.5.1. beschriebene mit der Enzymaktivität korrelierende Proteinbande bei 70 000 - 75 000 Molekulargewicht zeigte dasselbe veränderte Laufverhalten an der Mono Q Säule wie es für die Enzymaktivität gefunden wurde (Abb. 18 u. 19).

Abspaltung von Sialinsäureresten führte bei der Amidase zu einer Aktivitätserhöhung bei Verwendung von ^{3}H-Dap-markiertem Murein als Substrat. Dies kann man sich mit einer besseren Zugänglichkeit des Enzyms zum Substrat erklären.
Wurden dem Enzym die Muropeptide N-Acetyl-glucosaminyl(ß1-4) 1,6-Anhydro-N-acetyl-muramyl-Tetra-(Tri-)peptid angeboten, so war kein Unterschied in der spezifischen Aktivität der Amidase vor und nach Inkubation mit der Neuraminidase festzustellen (Tab. 7).

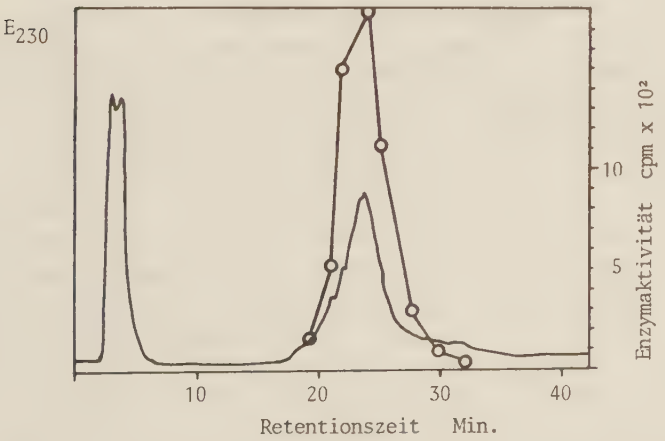


Abb. 18: *Trennung der Amidase an Mono Q nach Inkubation mit Neuraminidase. Bedingungen vgl. Abb. 15.*
—— Extinktion bei 230 nm, -o- Enzymaktivität.

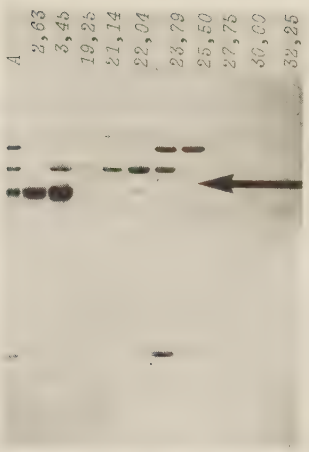


Abb. 19: Poylacrylamidgel nach Trennung der vorgereinigten und mit Neuraminidase gespaltenen Amidase an Mono Q. Die vermutliche Proteinbande des Enzyms (durch einen Pfeil markiert) der Fraktionen mit 22,04 23,79 und 25,50 Min. Retentionszeit zeigt nach der Sialinsäureabspaltung die gleiche Änderung im Laufverhalten wie die Enzymaktivität (vgl. Abb. 16). Der Verlauf der Enzymaktivität ist in Abb. 18 wiedergegeben.
A vorgereinigtes Enzym (Ionenaustauscher, Gelfiltration) nach Neuraminidasespaltung und vor der Trennung an Mono Q; die Zahlen über den Gelspuren geben die mittlere Retentionszeit der jeweiligen Fraktion an.

3.6.6. Reinigungsgang

Durch geeignete Kombination der beschriebenen Trennverfahren konnte die N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase aus dem Serum um den Faktor 56 angereichert werden. Im folgenden wird ein typischer Aufarbeitungsgang beschrieben; die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

1. Schritt: 1. DEAE-Sephadex A 50-Säule

80 ml Humanserum wurden zur Erniedrigung der Ionenstärke gegen Puffer (wie in 2.2.13.2. beschrieben) dialysiert. Nach Entfernung ausgefallener Proteine durch Zentrifugation wurde das Serum auf eine DEAE A 50-Säule aufgepumpt. Da die Proteinmenge des Serums an der oberen Grenze der nutzbaren Kapazität des Ionenaustauschers lag, eluierte die Amidase nach Anlegen des NaCl-Gradienten über viele Fraktionen mit einem Gesamtvolumen von über 200 ml. Alle Fraktionen mit Enzymaktivität wurden vereinigt. Der Anreicherungsfaktor war mit 1,3 entsprechend gering.

2. Schritt: 2. DEAE-Sephadex A 50-Säule

Aus den gesammelten Fraktionen des 1. Reinigungsschrittes wurde das Kochsalz des Gradienten durch Dialyse beseitigt und das Enzym über eine 2. DEAE A 50-Säule unter gleichen Bedingungen wie im 1. Schritt gereinigt. Da hier die Beladung des Ionenaustauschers mit Protein wesentlich günstiger als bei der 1. Säule war, eluierte das Enzym in einem Volumen von 69 ml. Der Anreicherungsfaktor stieg auf über 3 und das Gesamtprotein veringerte sich von ursprünglich 4 800 mg auf 380 mg.

3. Schritt: Gelfiltration an Sephadex G 200 superfine

Vor der Weiterreinigung des an DEAE A 50 chromatographierten Enzyms über eine G 200 superfine Säule wurden die 69 ml Ionenaustauschereluat im Dialyseschlauch durch Osmose mit Polyäthylenglykol auf ein Volumen von 11 ml konzentriert. In zwei Ansätzen wurde das auf je 5,5 ml aufgeteilte Enzym über Gelfiltration aufgetrennt. Die Enzymaktivität eluierte in zwei Fraktionen von insgesamt 30 ml. Dieses Eluat wurde auf 10 ml eingeengt.

Nach dieser Reinigung mit zwei Konzentrierungsschritten wurden 7,7% der Ausgangsenzymaktivität in den verbleibenden 14 mg Gesamtprotein gefunden. Das Enzym war nun um den Faktor 26 angereichert.

Schritt 4a: Mono Q-Ionenaustauschchromatographie

Pro Lauf wurden 5% des nach Schritt 3 verfügbaren Materials auf die Säule gegeben. Die Enzym-Fraktionen, die von der Säule kamen, hatten ein Volumen von 1,15 ml, der Anreicherungsfaktor betrug 56 und die Gesamtaktivität hochgerechnet auf 20 Mono Q-Läufe betrug noch 4,8% der im Serum gemessenen Amidaseaktivität.

Schritt 4b: Mono Q-Ionenaustauschchromatographie nach Neuraminidasespaltung

Nachdem 0,5 ml Enzymlösung aus Schritt 3 mit der Neuraminidase vorinkubiert wurde, ergab die Reinigung des Enzyms keine nennenswerte Verbesserung der Anreicherung im Vergleich zu Schritt 4a. Diese Methode war mehr für die Charakterisierung als für die Reinigung des Enzyms von Bedeutung.

Tabelle 7: Reinigung der N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase. Die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität wurde mit N-Acetyl-glucosaminyl-(ß1-4)1-6-Anhydro-N-acetyl-muramyl-Tetra-(Tri)peptid als Substrat durchgeführt (vergl. 2.2.15.).

Reinigungsschritt	Volumen ml	Proteinkonz. mg/ml	Gesamtprotein mg	Gesamtaktivität µ Mol/Min.	spezifische Aktivität µ Mol/mg Min.	Anreicherungsfaktor	Ausbeute
Serum nach Dialyse	80	60	4 800	103	0,022		100%
1. Sephadex-DEAE-Säule	207	13	2 691	72	0,029	1,3	74%
2. Sephadex-DEAE-Säule	69	5,5	380	25,7	0,068	3,1	25%
Einengen auf 11 ml zweimal G 200 superfine	2 x 5	1,4	14	7,9	0,56	26,0	7,7%
*Mono Q Ionenaustauscher	20 x 1,15	0,168	4	4,9	1,23	56,0	4,8%
*Mono Q nach Neuraminidasespaltung	20 x 1,5	0,123	3,7	4,8	1,28	58,0	4,7%

*Für diese Präparationen wurde je Lauf nur 0,5 ml von der nach dem dritten Reinigungsschritt erhaltenen Enzymlösung eingesetzt. Gesamtaktivität und Gesamtprotein wurden entsprechend hochgerechnet.

3.6.7. Weitere Versuche, die Amidase zu reinigen

3.6.7.1. Bindung an das Substrat

3.6.7.1.1. Chitin

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Polysaccharidketten des Mureins mit denen des Chitins wurde untersucht, ob die Amidase mit dem "falschen Substrat", dem Chitin, wechselwirkt und sich dadurch von anderen Serumproteinen abtrennen läßt.

Jedoch zeigten die Überstände nach Inkubation des Enzyms mit Chitin und dem Abzentrifugieren des Chitins unverändert Enzymaktivität.

3.6.7.1.2. Mureinsäule

Wenn für die Erkennung des Substrats die Zuckerketten nicht ausreichend sind, so könnte eventuell eine Chromatographie an Murein als Säulenmaterial zur Reinigung der Amidase beitragen.

Auf eine kleine Säule (1,5 ml Bettvolumen) gefüllt mit Mureinsacculi wurde Enzymlösung bei niedriger Ionenstärke in der Kälte aufgegeben. Bei der nachfolgenden Elution mit Puffern steigender Ionenstärke konnte keine Enzymaktivität mehr gefunden werden.

3.6.7.2. Antikörper gegen die Amidase

Ein anderer Weg zur Enzymreinigung sollte über die Isolierung von monospezifischen Antikörpern gegen die Amidase beschritten werden. Da nach der bisherigen Reinigung sich die Enzymlösung in mehrere Proteinbanden auf dem Polyacrylamidgel aufspaltete,

das Molekulargewicht mit etwa 80 000 bekannt war, wurde der Versuch unternommen mit aus dem Gel ausgeschnittenen Banden eine Immunisierung von Kaninchen vorzunehmen.

Eine Enzymanreicherung über DEAE-Ionenaustauschchromatographie wurde über NaDS-Gelelektrophorese getrennt. Drei Gelstreifen, die einen Molekulargewichtsbereich von 80 000, 85 000 und 90 000 abdeckten wurden nach dem in 2.2.18.2. beschriebenen Verfahren präpariert und zur Immunisierung von drei Kaninchen eingesetzt.

3.6.7.2.1. Reinigung des Antiserums

Voraussetzung für die Messung der Inaktivierung der Humanamidase durch Antikörper aus Kaninchen ist die Befreiung des Antiserums von jeglicher Mureinhydrolaseaktivität. Da IgG spezifisch an Protein A von Staphylococcus aureus bindet (63,64), konnte das IgG mittels einer Protein A-Sepharose-Säule aus dem Antiserum isoliert werden. Die nach NaDS-Gelelektrophorese als rein nachgewiesene Immunglobulinfraktion wurde für die Amidaseinhibierungsversuche eingesetzt.

3.6.7.2.2. Test der Antikörper auf Enzyminhibierung

Mit den gegen die Proteinbanden mit dem Molekulargewicht 80 000, 85 000 und 90 000 gerichteten Antikörpern wurden Enzymlösungen verschiedener Verdünnungsstufen inkubiert. Nach Abzentrifugieren dieser Ansätze wurde die Amidaseaktivität der Überstände untersucht. Keine der drei IgG-Fraktionen zeigte irgendwelche Hemmung der Enzymaktivität. Die möglichen Ursachen dafür, daß keine Antikörper gegen die Amidase gefunden wurden können sein:

a) Die Konzentration der Amidase bei der Immunisierung war zu gering, um als Antigen zu wirken.
b) Die Amidase, die gegen Reduktionsmittel empfindlich ist, wurde im NaDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen gespalten und läuft daher in einem anderen Molekulargewichtsbereich.
c) Die Immunisierung war unwirksam.

3.6.7.2.3. ELISA am geblotteten Gel

Um die Wirksamkeit der in 3.6.7.2. beschriebenen Immunisierung zu prüfen, wurde ein NaDS-Gel mit derselben Enzymlösung wie für die Gewinnung der Antikörper beladen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden diese auf Nitrocellulose geblottet. Die Proteinspuren auf der Nitrocellulose wurden mit Antiserum und danach mit an Protein A gekoppelter Peroxidase inkubiert. Im ELISA konnte mit dem jeweiligen Antiserum keine spezifische Anfärbung der den Kaninchen gespritzten Proteine gefunden werden.

3.6.6.3. Untersuchung der Humanmilch auf Amidase

BOESMAN-FINKELSTEIN und FINKELSTEIN haben bei der Reinigung von Lysozym aus Muttermilch neben der basischen Hauptfraktion noch eine zweite Lysozymaktivität gefunden, die an der stark negativ geladenen Heparin-Sepharose nicht bindet (65). Sie erklären diesen Effekt durch die Komplexierung von Lysozym mit sauren Proteinen. Lysozym wurde von den Autoren spektrophotometrisch über die Lyse von hitzegetöteten Bakterien (Micrococcus lysodeikticus) nachgewiesen.

Auf Grund dieser Befunde und des Umstands, daß auch die Serumamidase Murein von M. lysodeikticus zu hydrolysieren vermag, wurde im Hinblick einer leichteren Enzymreinigung aus der Milch geprüft, ob es sich bei der sauren Hydrolaseaktivität in der Muttermilch tatsächlich um Lysozym handelt.

50 ml Humanmilch wurden an QAE-Sephadex A 50 getrennt (vgl. 2.2.13.3.2.). In Fraktionen, die erst nach Anlegen eines Kochsalzgradienten von der Säule eluierten, also in den sauren Proteinfraktionen, wurde schwache Mureinhydrolaseaktivität gefunden. Die vollständige Inaktivierung dieser Enzymaktivität mit gegen Lysozym gerichteten Antikörpern brachte den Beweis, daß Lysozym in der Humanmilch die einzige nachweisbare Mureinhydrolase ist.

3.7. Wirkung der Amidase auf Bakterien

Den hitzestabilen, bakteriziden Substanzen im Blut fällt bei der Abwehr gram-positiver Bakterien eine bedeutende Rolle zu. So ist im Humanserum Lysozym der wichtigste Faktor bei der Abtötung von Bacillus subtilis (34). Die Amidase wurde auf ihre bakterizide Wirkung hin untersucht.

3.7.1. Gram-positive Bakterien

Die Testorganismen Micrococcus lysodeikticus, Staphylococcus aureus und Bacillus subtilis wurden durch Auftropfen der Amidase (gereinigt über DEAE-Sephadex) auf einen in den Agar gegossenen Bakterienrasen und durch Inkubation der Bakterien mit der Enzymlösung und anschließender Lebendzellzahlbestimmung untersucht. In keinem Falle konnte eine bakterizide Wirkung der Amidase nachgewiesen werden.

3.7.2. Gram-negative Bakterien - E. coli

Lysozym kann die Mureinschicht gram-negativer Bakterien nur angreifen, wenn die als Barriere wirkende äußere Membran z. B. durch osmotischen Schock überwunden wird (50).

Gibt man Amidase zu einer Bakteriensuspension, so kann das Enzym gleich dem Lysozym nicht durch die äußere Membran. Die Vitalität der Bakterien wurde bei diesem Versuch nicht beeinflußt.

3.7.2.1. Wirkung der Amidase auf osmotisch geschockte Zellen

Für Colicine wurde früher gezeigt, daß Zellen, denen der Rezeptor in der äußeren Membran fehlt unter Normalbedingungen unempfindlich gegenüber dem entsprechenden Colicin sind. Passiert das Colicin durch osmotischen Schock der Zellen die äußere Membran, so wird das ursprünglich resistente Bakterium abgetötet (49,66).

Auf dieselbe Weise wurde nun versucht, die Amidase an ihr Substrat, das Murein zu bringen, nachdem die Barriere äußere Membran durch osmotischen Schock überwunden wurde. Die Werte in Tabelle 8 zeigen die Wirkung der Amidase auf osmotisch geschockte Zellen. Allein der osmotische Schock führte zu einer Halbierung der Lebendzellzahl. Durch den Zusatz der Amidase in der Schockflüssigkeit wurde die Vitalität um weitere 30% erniedrigt.

Tab. 8: Absterberaten von E. coli K 12 nach osmotischem Schock mit und ohne Amidasebehandlung. Das Schockexperiment wurde durchgeführt nach 2.2.10. Methode 1.

Bedingungen	Abtötungsrate in %
osmotischer Schock mit Amidase	86
osmotischer Schock alleine	56
Amidase alleine	0
kein osmotischer Schock, keine Amidase	0

3.7.2.2. Wirkung der Amidase nach EDTA-Behandlung und osmotischem Schock der Zellen

EDTA bewirkt eine Destabilisierung der äußeren Membran (67). Die Kombination EDTA-Behandlung mit darauf folgendem osmotischem Schock verursachte in Anwesenheit der Amidase Lyse bei E. coli. Abb. 20 zeigt den zeitlichen Verlauf der Abnahme der optischen Dichte der Zellen in einem Lyseexperiment. Eine Bestimmung der Lebendzellzahl ergab, daß in der Probe mit der Amidase nach 10 Min. fünfzigmal weniger Bak-

terien überlebten als im Kontrollexperiment ohne Enzymzugabe. Nach 16 Min. Versuchsdauer überlebten nach Amidasezugabe 1% der Zellen des Kontrollwerts.

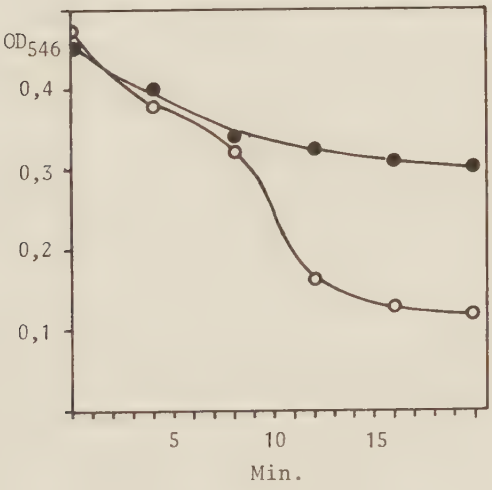


Abb. 20: Lysisverhalten von E. coli unter EDTA/Amidaseeinwirkung. Zu 8 ml plasmolysierter Zellen in 0,2 M Tris/HCl-Puffer pH 8 mit 0,5 M Saccharose und 0,5 mM EDTA wurden bei 4°C 0,45 ml Enzymlösung oder 0,45 ml PBS gegeben. Die Suspension wurde danach mit deion. dest. Wasser im Verhältnis 1 : 1 geschockt. Im Photometer wurde die OD_{546} der Zellsuspension verfolgt.

-o- Amidase, -●- Phosphat-gepufferte Saline (PBS).

4. Diskussion

4.1. Spaltungsspezifität

Trotz Inaktivierung von Lysozym durch Antikörperfällung verblieb im Humanserum noch eine "Restaktivität", die wie das Lysozym in der Lage war, aus ^{3}H-Dap-markierten Mureinsacculi von E. coli lösliche Radioaktivität freizusetzen.

Der erste Beweis, daß es sich bei der Mureinhydrolase nicht um eine - bei vielleicht unvollständiger Lysozymneutralisierung - Restaktivität des Lysozyms handelte, konnte durch eine säulenchromatographische Auftrennung von Lysozym und der unbekannten Mureinhydrolase erbracht werden (Abb. 4). Mit Antilysozym IgG konnte nur Lysozym, nicht aber das andere Enzym inaktiviert werden.

Durch die Spaltung von N-Acetyl-glucosaminyl (ß1-4)-N-Acetyl-muramyl-Tetra-(Tri-)peptid (C5/C6) konnte gezeigt werden, daß dieses Enzym sich auch in der Spaltungsspezifität vom Lysozym unterscheidet. Weitere Klarheit über die Wirkungsweise brachte eine präparative Auftrennung über Papierchromatographie und die Isolierung der verschiedenen Reaktionsprodukte nachdem ganze Mureinsacculi mit dieser Hydrolase verdaut wurden. Durch Analyse im Aminosäureanalysator konnten die verschiedenen Abbauprodukte identifiziert werden. Die Komponente, die am Start des Chromatogramms liegen blieb war der Zuckeranteil des Mureins. Hier wurden keine Aminosäuren gefunden (Tab. 4a). Die Desmuramylpeptide des Mureins wurden absolut zuckerfrei in Flecken mit verschiedener Beweglichkeit im Chromatogramm gefunden. Dieses Ergebnis läßt nur den einen Schluß zu, daß diese Mureinhydrolase eine N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase ist, d. h. sie spaltet die Amidbindung zwischen N-Acetyl-muraminsäure und Alanin im Mureinsacculus oder in Fragmenten dieses Makromoleküls. Dieser Befund stimmt mit den nach Abschluß dieser Versuche von VALINGER et al. publizierten Ergebnissen überein (68).

Die Arbeitsgruppe interessierte sich für den Stoffwechsel von appliziertem Mureinmonomer in Mäusen und konnte zeigen, daß das Peptidoglycanmolekül in Disaccharid und Pentapeptid gespalten wurde.

4.2. Substratspezifität

Wie bereits ausgeführt, sind die Mureinmonomere C5 und C6 ein passendes Substrat für die Amidase. Nach Inkubation vom Mureinlipoprotein-Komplex aus E. coli konnten aminosäurefreie Zuckerketten isoliert werden (3.4.4.). Daraus läßt sich ableiten, daß das Enzym die Amidbindung auch nach Ausbildung von Peptidbrücken zwischen oder innerhalb der Zuckerketten zu spalten imstande ist. Auch stellt das Lipoprotein, das an die Diaminopimelinsäure jedes 10 - 12 Muropeptids über eine Amidbindung geknüpft ist, kein unüberwindbares Hindernis für die Peptidspaltung durch die Amidase dar. Das Enzym kann aus dem vielschichtigen Murein von M. lysodeikticus Peptide herausspalten. Die dritte Aminosäure im Peptid (bei E. coli Diaminopimelinsäure und bei M. lysodeikticus Lysin) und der Glycinrest an der zweiten Peptidaminosäure bei M. lysodeikticus spielen also für die Substratspezifität der Amidase keine entscheidende Rolle.

Dagegen ist Lysozym, die zweite Mureinhydrolase im Serum gegenüber Modifikationen an der Mureinstruktur in seinem Spaltungsvermögen empfindlich. Stämme von Micrococcus lysodeikticus mit O-Acetyl-Gruppen substituiertem Murein sind gegen Lysozym resistent(69). Natürlich vorkommendes O-acetyliertes Gonokokkenmurein wird durch Humanlysozym nur teilweise hydrolysiert, amidasehaltiges Serum führt zur vollständigen Lyse der Mureinsacculi wie ROSENTHAL et al. zeigen konnten (70).

4.3. Charakterisierung

Die Suche nach dem pH-Optimum der N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase brachte ein unerwartetes Ergebnis. Wurde dem Enzym N-Acetyl-glucosaminyl-(ß1-4) 1,6-Anhydro-N-acetyl-muramyl-Tri-(Tetra-)peptid (X/X'), ein Lysozymabbauprodukt des Mureins angeboten, so nahm mit steigendem pH die Aktivität zu. Bei einem alkalischen Meßwert von pH 10 war die Amidase am aktivsten. Messungen bei höheren pH-Werten wurden nicht durchgeführt, weil hier die Gefahr der Autolyse des Substrats durch ß-Elimination bestand. Das unphysiologische pH-Optimum läßt dieses Mureinmonomere als natürliches Substrat unwahrscheinlich erscheinen.

Wurde die Solubilisierung von Mureinsacculi aus E. coli bei verschiedenen pH-Werten untersucht, so ergab sich ein ganz anderes Bild. Das pH-Optimum lag im schwach Sauren. Ein zweites kleines, aber reproduzierbares pH-Maximum wurde bei pH 9 gefunden (Abb. 9).

Als Erklärung für das Zustandekommen dieser widersprüchlichen Ergebnisse kann eine andere Konformation der Peptidseitenketten im Mureinsacculus angenommen werden als bei den Mureinmonomeren.

Das Molekulargewicht wurde über Gelfiltration an Sephadex G 100 und Sephadex G 200 sf bestimmt. Es wurden für das Enzym Werte von über 70 000 (G 100) und von 82 000 (G 200 sf) gemessen. Die Abweichungen könnten ihre Ursache in Zucker - Zukker Wechselwirkungen zwischen der Säulenmatrix und dem Enzym haben.

Durch den Nachweis der Abspaltung von Sialinsäureresten durch Neuraminidase wurde die Amidase als Glykoprotein klassifiziert.

Die Empfindlichkeit gegen reduzierende Substanzen weist auf Schwefelbrücken im intakten Enzym hin.

4.4. Reinigung

Eine teilweise Reinigung der N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase wurde über vier Schritte erreicht durch Kombination von Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie. Nach der Chromatographie an DEAE-Sephadex A-50 (Schritt 1 und 2) verringerte sich die Aktivität auf ein viertel. Als mögliche Ursachen kommen in Frage a) ein Enzymverdau durch Serumproteasen, b) die Abtrennung eines Cofaktors, der für die volle Enzymaktivität notwendig ist. Daß nach dem nächsten Schritt die Gesamtenzymaktivität nochmals eine Erniedrigung um den Faktor 4 erfuhr, kann an den beiden Konzentrierungsschritten vor und nach der Gelfiltration, aber auch an reduzierter Enzymstabilität in dünnen Proteinlösungen liegen. Nach dem letzten Reinigungsschritt wurde noch 5% Enzymaktivität gefunden bei einer über fünfzigfachen Anreicherung.

Bei der Chromatographie am Anionenaustauscher eluierte die N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase in einem großen Volumen. Ein Grund dafür mag ein unterschiedlicher Glykosylierungsgrad innerhalb der Enzymfraktion sein. Abhilfe würde hier vielleicht eine Behandlung der Amidase nach der 1. Säule mit Neuraminidase oder mit Glykosidasen schaffen. Zum anderen ändert eine solche Abspaltung die Affinität des Enzyms gegenüber der Ionenaustauschersäule und bietet so eine weitere Möglichkeit der Anreicherung. Durch die hydrolytische Freisetzung von Sialinsäure mit Neuraminidase konnte gezeigt werden, daß enzymatische Einwirkungen am Kohlenhydratteil der Amidase ihre Aktivität nicht mindern. Mit N-Acetyl-glucosaminyl-(ß1-4) 1,6-Anhydro-N-acetyl-muramyl-Tri-(Tetra-)peptid als Substrat war die Enzymaktivität praktisch unverändert, wohingegen die Aktivität bei der Hydrolyse von Mureinsacculi zunahm als Folge der erleichterten Zugänglichkeit des Enzyms zum Substrat durch die Abspaltung der negativ geladenen Sialinsäurereste.

An den dritten Reinigungsschritt, eine Gelfiltration, schloß sich eine schnelltrennende Flüssigkeitschromatographie an Mono Q an. Bei diesem letzten Schritt wurde mit und ohne Neuraminidase inkubierte Enzymfraktion aufgetrennt. In beiden Fällen konnte in der anschließenden Analyse der Säulenfraktionen im NaDS-Gel eine Proteinbande identifiziert werden, welche mit der Enzymaktivität der einzelnen Fraktionen korrelierte (Abb. 16, 19). Das Molekulargewicht dieses Proteins bewegte sich zwischen 70 000 und 75 000.

Bei Reinigungsversuchen an Phenylsepharose wurde ebenso eine Proteinbande mit etwa 75 000 Molekulargewicht im NaDS-Gel entdeckt, deren Intensität in direkter Beziehung zur Aktivität der zugehörigen Fraktionen stand (Abb. 14). Jedoch wurde diese Methode wegen der großen Minderung der Gesamtaktivität nicht weiterverfolgt.

Mit der Gewinnung von Antikörpern gegen die Amidase sollte ein sehr spezifisches Werkzeug geschaffen werden, um das Enzym zu reinigen. Wie Bindungsstudien im ELISA zeigten, schlug der Versuch fehl, spezifische Antikörper gegen Proteine zu gewinnen, die aus Polyacrylamidgelen isoliert wurden.

4.5. Biologische Bedeutung

Bei den untersuchten gram-positiven Stämmen B. subtilis, M. lysodeikticus und S. aureus wurde keine direkte bakterizide Wirkung der Amidase gefunden. Es sind jedoch antibakterielle Effekte im Zusammenwirken mit anderen Mureinhydrolasen denkbar, besonders bei Bakterienstämmen, in welchen Murein durch Modifikation für das Lysozym nicht mehr oder nur noch teilweise hydrolysierbar ist.

Andere Verhältnisse sind bei gram-negativen Bakterien anzutreffen. Die äußere Membran schützt den einschichtigen Mureinsacculus von außen vor hydrolytischen Enzymen.

Daher wurde durch EDTA-Behandlung und osmotischen Schock die

Integrität der äußeren Membran von E. coli zerstört. Unter diesen Bedingungen konnte in Analogie wie es beim Lysozym beobachtet wurde (50) sowohl Bakteriolyse, als auch eine bakterizide Wirkung durch die N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase gemessen werden.

Welche Rolle fällt der Amidase bei der Lyse von gram-negativen Bakterien im Serum zu?
Da lysozymfreies Serum nicht zur Sphäroplastenbildung mit darauffolgender Lyse bei E. coli führt (24,71), muß davon ausgegangen werden, daß Lysozym der erste bakteriolytische Faktor ist. Die Ursache hierfür kann in der Art des Komplementangriffes auf die Zelle liegen. Der aus den späten Komplementkomponenten gebildete Kanal durch die Zellmembran ist selektiv und für große Proteine (z. B. Thiogalactosid-Transacetylase, Molekulargewicht 63 500) undurchlässig (18,9, 72). Der Innendurchmesser des Komplementkanals von 100 Å ermöglicht dem positiv geladenen Lysozym das Passieren der äußeren Membran und den Zugang zum Murein. Der Amidase bleibt der Weg durch den Komplementkomplex aufgrund ihrer Ladung und Größe von ca. 80 000 Molekulargewicht versperrt. Erst wenn unspezifische Läsionen an der Zelloberfläche entstehen, erreicht die Amidase das Murein und kann wirken.

Ein ganz anderer biologischer Aspekt, bei dem die Amidase eventuell eine Bedeutung hat, sind die Adjuvansaktivitäten von bakteriellen Zellwänden. Als minimale adjuvansaktive Struktur im kompletten Freundschen Adjuvans wurde das N-Acetyl-muramyl-Dipeptid nachgewiesen (73). Für E. coli wurde von ELLOUZ et al. gezeigt, daß für die Stimmulation der humoralen Antikörperproduktion das Mureinmonomere (Disaccharid-Tri-(Tetra-)peptid) ausreichend ist (73). Dagegen sind sowohl N-Acetyl-glucosaminyl-1,4-N-Acetyl-muraminsäure als auch das Tri-(Tetra-)peptid inaktiv; d.h. über die N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidaseaktivität wird die Wirkung des Mureins als Adjuvans direkt beeinflußt.

Durch eine einmalige Injektion einer wäßrigen Zellwandsuspension von Streptokokken der Gruppe A ist es möglich eine

experimentelle Arthritis zu erzeugen (74,75). Die wirksame Zellwandstruktur ist dabei der Peptidoglycan-Polysaccharid-Komplex (PG-PS). Bei Ratten ist eine durch intraperitoneale Injektion von PG-PS hervorgerufene Arthritis klinisch, histologisch und radiologisch der rheumatischen Arthritis beim Menschen sehr ähnlich (74,76). Für die Schwere der Arthritis im Rattenmodell spielt die Größe des PG-PS-Komplexes eine wichtige Rolle (77). CHETTY et al. konnten mit einer N-Acetyl-muramyl-L-Alanin Amidase aus einem Streptokokkenphagen den PG-PS-Komplex zu kleinen Fragmenten abbauen, welche keine Arthritiswirkungen mehr hatten (78). Vielleicht kommt der Amidase im Serum eine ähnliche Funktion zu.

5. Zusammenfassung

Neben Lysozym gibt es im Humanserum noch eine zweite Mureinhydrolase. Unter Verwendung von Murein-Lipoprotein aus E. coli konnte gezeigt werden, daß dieses Enzym eine Amidase ist, die die Bindung zwischen N-Acetyl-muraminsäure und Alanin in der Peptidseitenkette spaltet. Die vollständige Abspaltung der Peptidseitenketten vom Mureinsacculus, einschließlich der Peptide an welche Lipoprotein kovalent gebunden ist, wurde bei E. coli nachgewiesen. Bei Micrococcus lysodeikticus wurde eine teilweise Hydrolyse der Peptidseitenketten durch die Amidase gefunden.

Dieses Enzym wurde von Lysozym abgetrennt und partiell gereinigt. Der Anreicherungsfaktor betrug 56. Eine Größenbestimmung über Gelfiltration ergab ein Molekulargewicht um 80 000 für diese Mureinhydrolase. In Übereinstimmung mit diesem Resultat wurde nach Polyacrylamidgelelektrophorese von angereicherten Enzympräparationen eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von über 70 000 gefunden, deren Intensität mit der Enzymaktivität korrelierte.

Daß die Amidase nach Inkubation mit Neuraminidase basischer wurde, ließ sich durch die Abspaltung von Sialinsäureresten erklären. Dieses modifizierte Glykoprotein hatte gegenüber Murein eine erhöhte Aktivität.

Die Enzymaktivität wurde durch 1 mM p-Chlormercuribenzolsulfonsäure oder 0,2 mM Äthylenglycol-bis(2-amino-methyl)-tetraacetat (EGTA) gehemmt, nicht jedoch von 5 mM EDTA.

E. coli, M. lysodeikticus, Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus werden durch die Amidase nicht getötet. Nur wenn durch osmotischen Schock der Zellen die als Barriere wirkende äußere Membran überwunden wird, verhält sich die N-Acetyl-muramyl-Alanin Amidase bakteriolytisch und bakterizid gegen E. coli.
Im Zusammmenhang mit der Enzymspezifität wurde über mögliche Funktionen der Amidase im Humanserum diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

1. Fodor, J. 1887.
   Dtsch. Med. Wochenschr. 13: 745-747.

2. von Behring, E. 1888.
   Centralb. Klin. Med. 9: 681-690.

3. Buchner, H. 1889.
   Zbl. Bakt. Parasitenkde. 5: 817-823.

4. Taylor, P.W. 1983.
   Microbiol. Rev. 47: 46-83.

5. Schreiber, R.D., D.C. Morrison, E.R. Podack & H.J. Müller-Eberhard. 1979.
   J. Exp. Med. 149: 870-882.

6. Boros, T. & H. J. Rapp. 1965.
   Science 105: 505-506.

7. Reed, W.P. & E.L. Albright. 1974.
   Immunology 26: 205-215.

8. Skarnes, R.C. 1978.
   Infect. Immun. 19: 515-522.

9. Taylor, P.W. & H.P. Kroll. 1983.
   Infect. Immun. 39: 122-131.

10. Tranum-Jensen, J., S. Bhakdi, B. Bhakdi-Lehnen, O.J. Bjerrum & V. Speth. 1978.
    Scand. J. Immunol. 7: 45-56.

11. Mayer, M.M. 1981.
    John Hopkins Med. J. 148: 243-258.

12. Inoue,K., A. Takamizawa, K.I. Yano & T. Amano. 1974.
Biken J. 17: 127-134.

13. Inoue, K., T. Kinoshita, M. Okada & Y. Akiyama. 1977.
J. of Immunol. 119: 65-72.

14. Mayer, M.M. 1961.
In E.A. Kabat and M.M. Mayer (ed.), Experimental immunochemistry, 2nd ed. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Ill. 133-240.

15. Feingold, D.S., J.N. Goldman & H. M. Kuritz. 1968.
J. Bacteriol. 96: 2118-2126.

16. Martinez, R.J. & S.F. Carroll. 1980.
Infect. Immun. 28: 735-745.

17. Bayer, M.E. 1975.
In A. Tzagoloff (ed.), Membranebiogenesis. Plenum Publishing Corp. New York. 393-427.

18. Wright, S.D. & R.P. Levine. 1981.
J. Immunol. 127: 1146-1151.

19. Konisky, J. 1982.
Ann. Rev. Microbiol. 36: 125-144.

20. Esser, A.F. 1980.
Fed. Proc. 39: 1755-176 .

21. Lint, T.F., H.J. Zeitz & H. Gewurz. 1980.
J. Immunol. 125: 2252-2257.

22. Inoue, K., Y. Tanigawa, M. Takubo, J. Satani & T. Amano. 1959.
Biken J. 2: 1-20.

23. Wardlaw, A.C. 1962.
J. Exp. Med. 115: 1231-1248.

24. Glynn, A.A. & M. Milne. 1967.
Immunology 12: 639-653.

25. Gemsa, D., S.D. Davis & J.R. Wedgood. 1966.
Nature (London) 210: 950-951.

26. Amano, T., T. Morioka, Y. Seki, S. Kashiba, K. Fujikawa & S. Ichikawa. 1955.
Med. J. Osaka Univ. 6: 709-716.

27. Glynn, A.A. 1969.
Immunology 16: 463-471.

28. Glynn, A.A. & M. Milne. 1965.
Nature (London) 207: 1309-1311.

29. Myrvik, Q.N. & R.S. Weiser. 1955.
J. Immunol. 74: 9-16.

30. Muschel, L.H., L. Gustafson & L.J. Larsen. 1969.
Immunology 17: 525-533.

31 Carroll, S.F. & R.J. Martinez. 1979.
Infect. Immun. 25: 810-819.

32. Carroll, S.H. & R.J. Martinez. 1981.
Biochemistry 20: 5973-5981.

33. Carroll, S.F. & R.J. Martinez. 1981.
Biochemistry 20: 5981-5987.

34. Selsted, M.E. & R.J. Martinez. 1978.
Infect. Immun. 20: 782-791.

35. Hirashima, A., Childs, G. & M. Inouye. 1973.
J. Mol. Biol. 79: 373-389.

36. Ryter, A., Y. Hirota & U. Schwarz. 1973.
J. Mol. Biol. 78: 185-195.

37. Braun, V. & H. Wolff. 1975.
J. Bacteriol. 123: 888-897.

38. Braun, V. & K. Rehn. 1969.
Eur. J. Biochem. 10: 426-438.

39. Hantke, K. 1973.
Dissertation, Universität Tübingen.

40. Böhlen, P., S. Stein, W. Dairman & S. Udenfriend. 1973.
Arch. Biochim. Biophys. 155: 213-220.

41. Castell, J.V., M. Cervera & R. Marco. 1979.
Anal. Biochem. 99: 379-391.

42. Bradford, M.M. 1976.
Anal. Biochem. 72: 248-254.

43. Spector, T. 1978.
Anal. Biochem. 86: 142-146.

44. Laemmli, U. K. 1970.
Nature (London) 227: 680-685.

45. Lugtenberg, B., J. Meijers, R. Peters, van der Hoek, P.
& van Alphen, L. 1975.
FEBS Lett. 58: 254-258.

46. Fairbanks, G., T.L. Steck & D.F.H. Wallach. 1971.
Biochemistry 10: 2606-2617.

47. Morrissey, J.H. 1981.
Anal. Biochem. 117: 307-310.

48. Tautz, D. 1981.
Diplomarbeit, Universität Tübingen.

49. Tilby, M., J. Hindenach & U. Henning. 1978.
J. Bacteriol. 136: 1189-1191.

50. Witholt, B., H. van Heerikhuizen & L. de Leij. 1976.
Biochim. Biophys. Acta 443: 534-544.

51. Goebel, W.F. & G.T. Barry. 1958.
J. Exp. Med. 107: 185-209.

52. Strominger, J.L. 1969.
In Th. Bucher and H. Sies (ed.), Inhibitor tools in cell research. Springer-Verlag, Berlin. 185-207.

53. Primosigh, J., H. Pelzer, D. Maass & W. Weidel. 1961.
Biochim. Biophys. Acta. 46: 68-80.

54. Biochemisches Taschenbuch. 1964.
Springer-Verlag, Berlin. 2. Teil: 93.

55. Towbin, M., T. Staehelin & J. Gorden. 1979.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4354.

56. Komischke, K. 1984.
Dissertation, Universität Tübingen.

57. Shugar, D. 1952.
Biochim. Biophys. Acta 3: 303-311.

58. Osserman, E.F. & D.P. Lawlor. 1966.
J. Exp. Med. 124: 921-951.

59. Keck, W. 1980.
Dissertation, Universität Tübingen.

60. Braun, V. & U. Sieglin. 1970.
Eur. J. Biochem. 13: 336-346.

61. Ghuysen, J.M., E. Bricas, M. Lache & M. Leyh-Bouille. 1968.
Biochemistry 7: 1450-1460.

62. Gold, A. M. 1965.
Biochemistry 4: 897-901.

63. Hjelm, H., K. Hjelm & J. Sjöquist. 1972.
FEBS Lett. 28: 73-76.

64. Kronvall, G. 1973.
Scand. J. Immunol. 2: 31-36.

65. Boesman-Finkelstein, M. & R.A. Finkelstein. 1982.
FEBS Lett. 144: 1-5.

66. Braun, V., J. Frenz, K. Hantke & K. Schaller. 1980.
J. Bacteriol. 142: 162-168.

67. Leive, L. 1965.
Proc. Natl. Acad. Sic. USA 53: 745-750.

68. Valinger, Z., B. Ladešić & J. Tomašić. 1982.
Biochim. Biophys. Acta 701: 63-71.

69. Brumfitt, W., A.C. Wardlaw & J.T. Park. 1958.
Nature (London) 181: 1783-1784.

70. Rosenthal, R.S., W.J. Folkening, D.R. Miller & S.C. Swim. 1983.
Infect. Immun. 40; 903-911.

71. Amano, T., K. Fujikawa, T. Morioka, A. Miyama & S. Ichikawa. 1958.
Biken J. 1: 13-25.

72. Inoue, K., A. Takanizawa, T. Kurimura & K. Yonemasu. 1968.
Biken J. 11: 193-201.

73. Ellouz, F., A. Adam, R. Ciraru & E. Lederer. 1974. Biochem. Biophys. Res. Commun. 59: 1317-1325.

74. Cromartie, W.J., J.G. Craddock, J.H. Schwab, S.K. Anderle & C.Yang. 1977. J. Exp. Med. 146: 1585-1602.

75. Cromartie, W.J. 1981. In H. Deicker and L.C. Schulz (ed.). Arthritis-models and mechanisms. 24-38. Springer-Verlag, New York.

76. Clark, R. L., J.T. Cuttino, Jr., S.K. Anderle, W.J. Cromartie & J.H. Schwab. 1979. Arthritis Rheum. 22: 25-35.

77. Fox, A., R.R. Brown, S.K. Anderle, C.Chetty, W.J. Cromartie, H. Gooder & J.H. Schwab. 1982. Infect. Immun. 35: 1003-1010.

78. Chetty, C., D.G. Klapper & J.H. Schwab. 1982. Infec. Immun. 38: 1010-1019.

79. Schleifer, K.H. & O. Kandler. 1967. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 965-972.

LEBENSLAUF

Stefan Mollner
geboren am 18. 1. 1953 in Altdorf

1960 - 1965	*Besuch der Volksschule in Altdorf*
1965 - 1970	*Besuch der Otto-Rommel-Realschule in Holzgerlingen*
1970 - 1973	*Besuch des Technischen Gymnasiums in Sindelfingen*
ab Sommersemester 1974	*Studium der Biologie an der Universität Tübingen*
7. 4. 1976	*Vorprüfung zur Diplomprüfung in Biologie*
1979	*Anfertigung der Diplomarbeit "Lyseresistente Mutanten von Escherichia coli"*
17. 3. 1980	*Diplom-Hauptprüfung in Biologie*
April 1980 bis Februar 1984	*Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Lehrbereich Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun*

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Altendorf, D. Ammermann, F.-W. Bertrup, W.U. Berthold, V. Braun, D. Bunke, W. Engelmann, U. Feine, K.G. Grell, K.-P. Hadeler, K. Hantke, W. Harder, V. Hemleben, E. Kallee, E. Kulzer, W. Löffler, G.F. Meyer, H. Metzner, F.-P. Möhres, F. Oberwinkler, K. Pelling, K. Poralla, H. Probst, W. Rähle, M. Renz, A. Rieker, E. Sander, H.U. Schairer, B. Schwemmle, H. Seiler, W. Seyffert, G. Weitzel, K. Wöhrmann, H. Wolf, S. Winkler, H. Zähner, R. Zielke, W. Zimmermann.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353